

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA DE  
INTEGRIDAD CELULAR EN EL HONGO  
FITOPATÓGENO *Ustilago maydis***

Tesis Doctoral

Natalia Carbó

Madrid 2009





Memoria presentada por Natalia Carbó para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. José Pérez-Martín.



# INDICE

ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN EN INGLÉS .....	11
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	15
2. CICLO DE VIDA DE USTILAGO MAYDIS .....	16
3. CICLO CELULAR EN USTILAGO MAYDIS .....	18
4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: CASCADAS MAPK.....	20
5. RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR.....	23
6. RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	26
6.1 Componentes .....	26
6.2 Dianas de acción de la MAP quinasa Slt2.....	28
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1. ESTIRPES Y PLÁSMIDOS .....	39
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	41
2.1 Medios y condiciones generales .....	41
2.2 Medios y soluciones para el crecimiento de <i>U. maydis</i> .....	42
2.3 Regeneración y selección de transformantes .....	42
2.4 Ensayos de apareamiento y formación de filamentos .....	43
2.5 Diluciones seriadas .....	43
2.6 Promotores regulables y constitutivos en <i>U. maydis</i> .....	43
3. METODOLOGÍAS GENÉTICAS.....	44
3.1 Construcción de plásmidos recombinantes.....	44
3.2 Reacciones de amplificación .....	44
3.3 Extracción de ADN genómico de <i>U. maydis</i> .....	44
3.4 Transformación de <i>U. maydis</i> .....	45
4. METODOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE PROTEÍNAS .....	45
4.1 Extracción de proteínas de <i>U. maydis</i> .....	45
4.2 Inmunoprecipitación .....	46
4.3 Ensayo quinasa .....	46
4.4 Western blot.....	47
5. MICROSCOPIA .....	47
5.1 Tinción de núcleos.....	48
5.2 Tinción de septos.....	48
5.3 Tinción de apresorios.....	48
5.4 Tinción de filamentos dentro de la planta.....	49
5.5 Determinación del Ratio N/C .....	49

6. INFECCIÓN DE PLANTAS ZEA MAYS.....	49
7. ANÁLISIS IN SILICO DE LAS SECUENCIAS.....	50
8. CONSTRUCCIÓN DE LAS DISTINTAS ESTIRPES DE U. MAYDIS .....	50
8.1 Delección de los genes <i>bck1</i> , <i>mkk1</i> y <i>slt2</i> .....	50
8.2 Construcción y expresión del alelo HA- <i>slt2</i> bajo el promotor <i>Pslt2</i> .....	51
8.3 Construcción y expresión del alelo HA- <i>slt2</i> <sup>AEF</sup> .....	52
8.4 Construcción y expresión del alelo HA- <i>slt2</i> <sup>KD</sup> .....	53
8.5 Expresión de <i>mkk1</i> bajo el promotor heterólogo <i>Pcrg1</i> .....	53
8.6 Construcción y expresión del alelo <i>mkk1</i> <sup>DD</sup> bajo el promotor heterólogo <i>Pcrg1</i> .....	54
8.7 Expresión del alelo <i>mkk1</i> <sup>DD</sup> bajo el promotor <i>Pcrg1</i> desde el locus endógeno.....	55
8.8 Delección del gen <i>rlm1</i> .....	56
8.9 Delección de los genes <i>rcl1</i> y <i>rcl2</i> .....	56
8.10 Delección del gen <i>spa2</i> .....	57
8.11 Expresión del alelo <i>spa2</i> -GFP .....	57
8.12 Expresión del alelo <i>mkk1</i> -GFP.....	58
8.13 Expresión del alelo GFP- <i>slt2</i> .....	59
8.14 Construcción y expresión de los alelos T7- <i>rhos</i> <sup>QL</sup> bajo el promotor heterólogo <i>Pcrg1</i> .	59
8.15 Sustitución de los promotores silvestres <i>Prho</i> por el promotor regulable <i>Pnar1</i> .....	60
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
1. MODULO CENTRAL MAP QUINASA .....	65
1.1 Identificación de las MAPKs de integridad celular en U. maydis .....	65
1.2 <i>Bck1</i> , <i>Mkk1</i> y <i>Sl2</i> constituyen una sola vía de señalización MAP quinasa: La ruta de integridad celular .....	66
1.3 El estrés producido por agentes que dañan la pared activan la MAP quinasa <i>Sl2</i> .....	70
1.4 La fosforilación y la actividad quinasa de <i>Sl2</i> son necesarias para la viabilidad de las células frente a un estrés de pared .....	73
1.5 La hiperactivación de la ruta de integridad celular tiene un efecto tóxico en U. maydis .....	75
1.6 El efecto tóxico producido por el alelo <i>mkk1</i> <sup>DD</sup> requiere de la fosforilación y actividad quinasa de <i>Sl2</i> .....	78
1.7 La activación de <i>Sl2</i> produce células con múltiples compartimentos cada vez mas pequeños, de un solo núcleo .....	79
2. POSIBLES PROTEÍNAS DIANA DE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR.....	82
2.1 U. maydis tiene un putativo factor de transcripción <i>Rlm1</i> .....	82
2.2 U. maydis posee un putativo homólogo de <i>SBF</i> .....	86
2.3 La transición G2/M como blanco de acción .....	88
2.4 <i>Cdc25</i> una posible diana de la ruta de integridad celular en U. maydis .....	90
3. MODULO DE REGULACIÓN SUPERIOR .....	94
3.1 Identificación de las proteínas <i>Rhos</i> en U. maydis.....	94
3.2 <i>Rho1</i> , <i>Rho2</i> y <i>Rho4</i> posibles activadores de la cascada MAP quinasa .....	94

3.3 <i>Rho1</i> , posible regulador superior de la cascada .....	96
3.4 <i>UmPkc1</i> no es esencial para transmitir la señal de activación a <i>UmSlf2</i> .....	98
4. U. MAYDIS POSEE UNA PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE SPA2 .....	99
5. LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR Y EL PROCESO DE PATOGÉNESIS EN <i>U. MAYDIS</i> .....	103
5.1 <i>La cascada de MAP quinasa es dispensable para la infección de la planta</i> .....	103
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>107</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>123</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>133</b>
ANEXO 1 .....	135
ANEXO 2 .....	139



## **ABREVIATURAS**

aa: aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP c: Adenosil 3', 5' - monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

Cbx: carboxina

*cbx*: Succinato deshidrogenasa

CFW: calcoflúor

Ci: Curio

CPZ: clorpromazina

DAPI: 4', 6' - diamidino-2- fenilindol

dCTP: 2'-desocicitidina-5'-trifosfato

DMSO: dimetil- sulfóxido

dNTP: desoxirribonucleótido

DO<sub>600</sub>: densidad óptica a longitud de onda 600nm

DTT: 1,4-ditiotreitol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EGTA: ácido etilenglicoltetracético

Fig.: figura

GFP: proteína fluorescente verde

h: hora

Hyg: higromicina

J: Julio

kb: kilobase

kDa: kilodalton

MOPS: ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico

Nat: nourseotricina

NP-40: octilfenilpolientilenglicol

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RC: Rojo Congo

SDS: dodecil sulfato sódico

WGA-FITC: Aglutinina del germen de trigo asociada a flourocromo



## **RESUMEN EN INGLÉS**

All living organisms use numerous signal-transduction systems to sense and respond to their environment and thereby survive and proliferate in a range of biological niches. Molecular dissection of this signalling network has increased the understanding on important processes as cell growth, differentiation and cell death.

Fungi are excellent models to study environmental sensing because of their simple, but eventually evolutionary conserved signal-transduction pathways that are often equivalent to those present in multicellular eukaryotic organisms. Among these signalling pathways present in fungi, the MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) pathways stand out for their relevant roles in pathogenicity.

*Ustilago maydis*, a basidiomycete fungus responsible for corn smut is an excellent model system to study the pathogenicity at a molecular level. In this fungus, there is a well-characterised MAPK pathway involved in pheromone response. However, little is known about the role of other MAPK pathways, such as the cell wall integrity one. In *Saccharomyces cerevisiae*, the well-studied Slit2/Mpk1 MAP kinase pathway has been shown to monitor cell wall integrity, promote cell wall remodelling under stress conditions and also play a role in the coordination of polarized growth and cell cycle. Therefore, we seek to characterise, if any, the cell wall integrity MAPK pathway in *U. maydis*.

We have identified homologues of the *S. cerevisiae* Slit2/Mpk1 MAP kinase pathway in which Bck1, Mkk1 and Slit2 are the MAPKKK, MAPKK and MAPK, respectively. We have studied the loss of function with null mutants of these three kinases. All these null mutants were hypersensitive to cell wall stresses such as calcofluor white, chlorpromazine and caffeine. Even though they were able to infect maize. Moreover, we have studied the effect of a gain of function with a constitutive activated allele of MAPKK, *mkk1<sup>DDcrg1</sup>*. Expression of this *mkk1<sup>DDcrg1</sup>* allele severely affects growth, resulting in chains of cell compartments with one nucleus. These cell compartments became smaller and smaller in each cell division suggesting an involvement of this pathway in the regulation of the G2/M transition of the cell cycle.







## **1. Justificación del trabajo**

Todos los organismos vivos utilizan numerosos sistemas de transducción de señales para detectar y responder a las variaciones del medio ambiente y poder así sobrevivir y proliferar en una gran variedad de nichos biológicos. La disección molecular de estas redes de señalización ha aumentado nuestra comprensión de procesos tan importantes como el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Los hongos son excelentes modelos para el análisis de la percepción y transmisión de señales ambientales debido a que representan sistemas más simples de estudio. Por otra parte, las rutas de transducción de señales se encuentran, evolutivamente conservadas y son a menudo equivalentes a las presentes en organismos multicelulares. Ciertos estudios sobre estas vías de señalización también han facilitado el desarrollo de terapias que abordan las enfermedades infecciosas causadas por hongos patógenos de importancia médica (Bahn et al., 2007). Entre las rutas de transmisión de señales presentes en hongos, las cascadas MAPK destacan por su papel relevante en patogénesis (Lengeler et al., 2000; Xu, 2000).

*Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto fitopatógeno, responsable de la enfermedad conocida como el carbón del maíz (Holliday, 1974). En los últimos años se ha convertido en un modelo ideal para estudios de fitopatología a nivel molecular debido a su fácil manejo en el laboratorio y a la existencia de un gran número de técnicas y herramientas para su modificación genética (Bolker, 2001; Kamper, 2004; Martinez-Espinoza et al., 2002). Durante los últimos años se han caracterizado exhaustivamente dos rutas de transducción de señales. La ruta de AMPc/PKA que se activa en respuesta a cambios en las condiciones nutricionales y una cascada MAPK que responde a feromona y a otros estímulos ambientales como variaciones en el pH o disponibilidad de nutrientes (para una completa revisión véase (Klosterman et al., 2007)).

Sin embargo, poco se sabe acerca del papel de otras rutas de transducción de señales, como la de integridad celular, en *Ustilago maydis*. Puesto que el proceso infectivo implica una remodelación de la pared celular debido al cambio en la forma de crecimiento del patógeno y una interacción entre la superficie

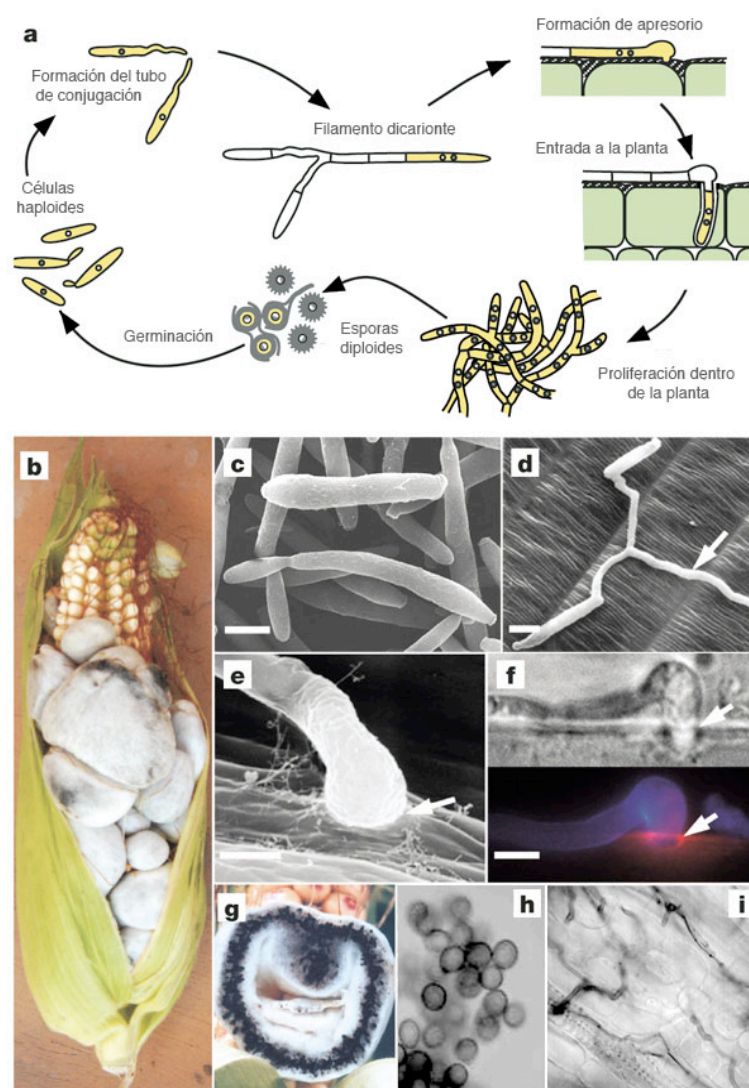
del patógeno y la de la planta, el estudio de esta ruta puede llevar a un mayor entendimiento de la enfermedad así como al desarrollo de antifúngicos más eficaces y al diseño de estrategias de biocontrol.

## **2. Ciclo de vida de *Ustilago maydis***

*U. maydis* tiene un ciclo de vida dimórfico (Fig.1a). En su fase haploide crece como levadura dividiéndose por gemación y es saprofita (Fig.1c). Para completar su ciclo sexual debe de pasar por su fase patógena, en la que crece como un micelio dicarionte en el interior de la planta de maíz (Fig.1b). La enfermedad produce un retraso en el crecimiento de las plantas y reduce el rendimiento, dando lugar a graves pérdidas económicas (Martínez-Espinoza et al., 2002).

La transición de la fase saprofita a la fase patógena se inicia con el apareamiento de dos células haploides compatibles para los alelos de tipo sexual. El reconocimiento celular tiene lugar mediante un sistema de feromona-receptor y da lugar a la formación, en cada célula, de una estructura denominada tubo de conjugación (Fig.1a). Los tubos de conjugación aparecen de forma polar y crecen según un gradiente de feromona (Snetselaar et al., 1996). Después de la fusión de los tubos de conjugación se genera un filamento dicarionte denominado tubo infectivo, que contiene los dos núcleos sin fusionar y el citoplasma de ambas células. El tubo infectivo crece apicalmente sobre la superficie de la planta, sin que tenga lugar ninguna división celular, hasta encontrar un lugar apropiado para la penetración (Fig.1d). En este momento forma una estructura denominada apresorio, a partir de la cual se introduce en el tejido vegetal (Fig.1e). Durante la penetración, la membrana plasmática del huésped se invagina alrededor de esta estructura (Fig.1f) y se desarrolla una zona de interacción entre las membranas de la planta y el hongo que se caracteriza por los depósitos resultantes de la exocitosis del patógeno (Bauer, 1997). Aunque el micelio dicarionte atraviesa las células vegetales, no hay una respuesta aparente de defensa de la planta y el tejido vegetal se mantiene vivo hasta una vez avanzado el proceso de infección (Fig.1i). El síntoma mas característico de la enfermedad es la

presencia de grandes tumores provocados por una alteración en el crecimiento de las células vegetales, inducida por el hongo. Dentro de los tumores, los filamentos se fragmentan dando lugar a células aisladas, dentro de las cuales tiene lugar la cariogamia (Snetselaar, 1992). Estas células diploides denominadas teliosporas, se rodean de una gruesa pared pigmentada y son el vehículo de dispersión (Fig.1h, g). La germinación de las teliosporas comienza con la meiosis y la posterior formación de un basidio de cuatro células, de cada una de las cuales se desarrolla una célula haploide, lista para iniciar un nuevo ciclo (Banuett, 1995).

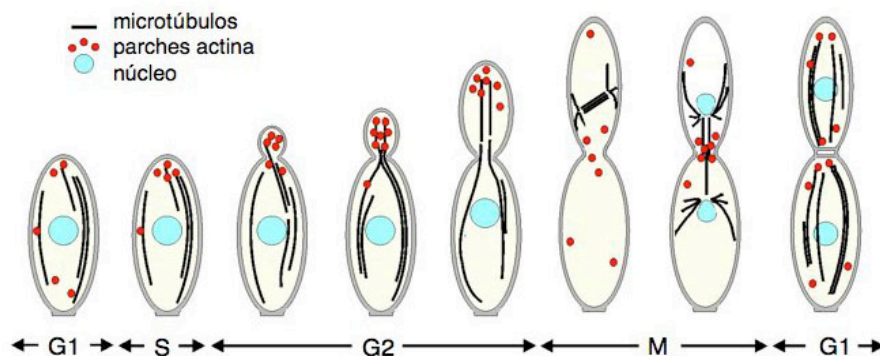


**Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.** El crecimiento por gemación puede continuar indefinidamente con la disponibilidad de nutrientes. Pero una vez recibida la señal de apareamiento, se forman los tubos de conjugación, ocurre la plasmogamia y la célula dicarionte resultante crece como filamento dejando secciones vacías por detrás hasta encontrar el lugar apropiado para la penetración. La aparición de tumores, pocos días después de la infección, son el síntoma característico de la enfermedad. Figura adaptada de (Kamper et al., 2006). Las barras corresponden a 5µm.

### 3. Ciclo celular en *Ustilago maydis*

En los organismos eucariotas el ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S (síntesis de ADN), G2 y M (mitosis). En la fase G1 la célula percibe las señales del medio que indicarán si las condiciones son o no las adecuadas para comenzar una ronda de ciclo celular. En la fase G2 se producen los principales puntos de control internos, de forma que las células controlan la correcta duplicación del ADN y se preparan para la segregación de la información genética (Smits y Medema, 2001).

Los primeros estudios del ciclo celular en *U. maydis* fueron abordados desde el punto de vista morfológico (Steinberg y Fuchs, 2004; Steinberg et al., 2001). *U. maydis* produce una única gema por ciclo celular. A diferencia de lo que ocurre en otras levaduras como *S. cerevisiae*, donde la formación de la gema está acoplada a la entrada en la fase S, en *U. maydis* la gema no se forma hasta que el ADN no se ha replicado completamente, siendo la aparición de la gema un indicador de la terminación de la fase S. Durante la mayor parte del crecimiento de la gema (fase G2) el núcleo se localiza en el centro de la célula madre y justo antes de la mitosis migra a la célula hija, donde tiene lugar la mitosis y posteriormente uno de los núcleos regresa a la célula madre (Steinberg et al., 2001). En condiciones normales de crecimiento, la fase G1 es corta y las células pasan el mayor tiempo en la fase G2 del ciclo celular, caracterizada por concentrar el crecimiento polar (Snetselaar, 1997)(Fig. 2).



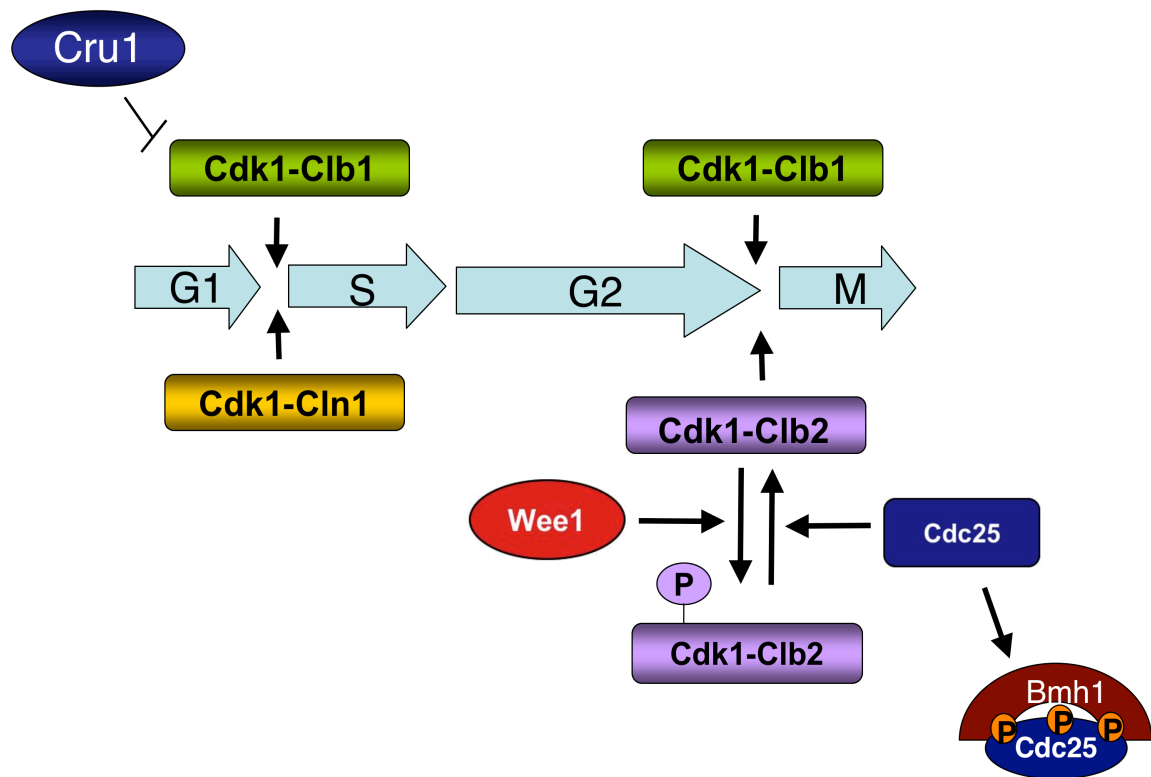
**Figura 2. Relación entre morfología y ciclo celular en *U. maydis*.** El crecimiento de la gema ocurre durante la fase G2. Antes de la mitosis el núcleo migra hacia la gema. Se observan haces de microtúbulos en todas las fases, salvo en M cuando se forma el huso mitótico. Los microtúbulos se indican con líneas negras, el núcleo en celeste y en rojo los parches de actina. Figura adaptada de (Perez-Martin et al., 2006)



La progresión a través de las distintas fases del ciclo celular viene determinada por la actividad quinasa de un complejo formado por una subunidad catalítica Cdk y una subunidad reguladora, la ciclina. En *U. maydis* se ha descrito una Cdk, la quinasa Cdk1 (Garcia-Muse et al., 2004) que es la encargada de unirse a las distintas ciclinas, promoviendo el paso por las distintas fases del ciclo celular. *U. maydis* presenta una ciclina de G1, Cln1 y dos ciclinas de tipo B, Clb1 y Clb2. El complejo formado por Cdk1/Cln1 está implicado en la regulación de la transición G1/S y el complejo formado por Cdk1/Clb2 en la transición G2/M. Mientras que el complejo Cdk1/Clb1 está involucrado en ambas transiciones del ciclo celular. La ciclina Cln1 está implicada en la regulación de la duración de la fase G1, el tamaño y la morfología celular (Castillo-Lluva y Perez-Martin, 2005). Por otro lado, Clb2 es esencial para la transición G2/M determinando la longitud de la fase G2 y por lo tanto el tamaño de la gema (Garcia-Muse et al., 2004).

Sobre los complejos Cdk/ciclina se ejercen variados mecanismos de control. En *U. maydis* se ha descrito la presencia de un adaptador del complejo APC (*Anaphase-Promoting Complex*), denominado Cru1 encargado de marcar la ciclina Clb1 para su degradación. Esta regulación parece ser importante para retrasar el paso G1/S y permitir alcanzar un tamaño suficiente para iniciar la replicación del ADN y posteriormente entrar correctamente en mitosis (Castillo-Lluva et al., 2004). También se ha descrito que la quinasa Wee1 está implicada en la fosforilación inhibitoria del complejo Cdk1/Clb2 (Sgarlata y Perez-Martin, 2005b) y la fosfatasa Cdc25 es responsable de la reversión de este proceso (Sgarlata y Perez-Martin, 2005a). El apagado de la expresión de *wee1* provoca una entrada rápida en mitosis asociada a una caída en los niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1. Mientras que la sobreexpresión de *wee1* provoca una parada del ciclo celular en G2. A su vez, la sobreexpresión de *cdc25* provoca una entrada rápida en mitosis asociada a una caída de niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1 y la represión de la expresión de *cdc25* provoca una parada del ciclo celular en G2 caracterizada por células con gemas alargadas. Recientemente se ha descrito un regulador negativo de Cdc25, una proteína de la familia 14-3-3 a la que se denominó Bmh1 (Mielnichuk y Perez-

Martin, 2008). Esta proteína se une a la fosfatasa Cdc25 y la localiza en el citoplasma retrasando la progresión G2/M (Fig. 3).



**Figura 3. Principales reguladores caracterizados del ciclo celular de *U. maydis*.** El complejo Cdk1/Clb1 interviene en las transiciones G1/S y G2/M, el complejo Cdk1/Cln1 en la transición G1/S y el complejo Cdk1/Clb2 en el paso G2/M. Cru1 es un regulador de la ciclina Clb1 en la fase G1. El complejo Cdk1/Clb2 es regulado por fosforilación inhibitoria. Bmh1 es un regulador negativo de Cdc25.

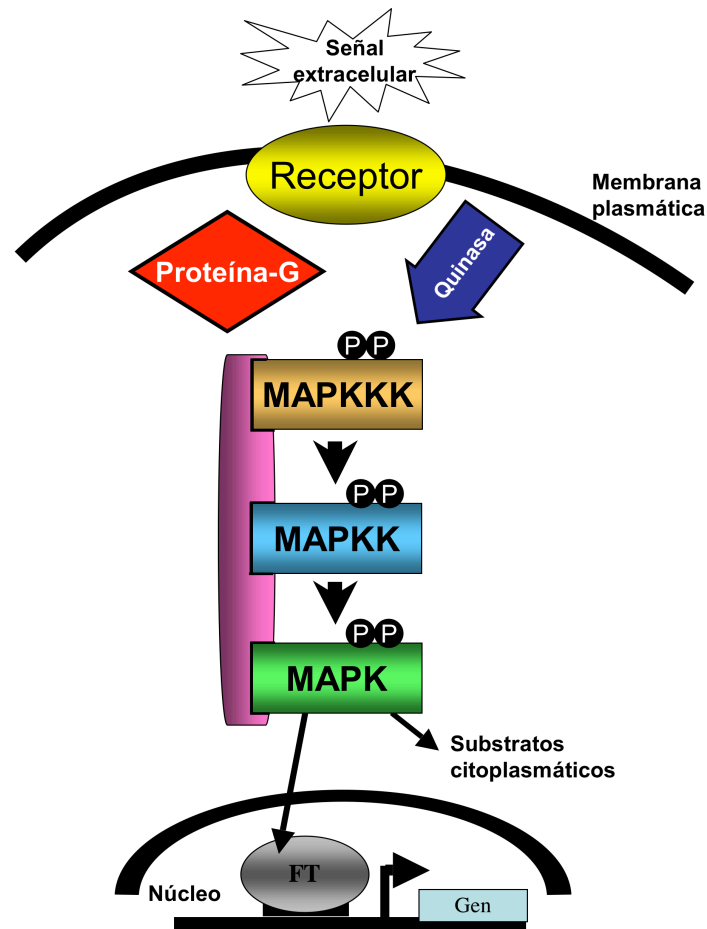
#### 4. Transducción de señales: Cascadas MAPK

La transducción de señal es el conjunto de procesos o etapas que ocurren de forma concatenada por el que una célula convierte una determinada señal o estímulo exterior, en otra señal o respuesta específica. La gran variedad de señales fisicoquímicas a las que las células pueden responder haría pensar en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señal. Sin embargo, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie limitada de cadenas de eventos que son capaces de generar una respuesta apropiada a cada estímulo en diferentes tipos celulares.

Las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógeno o MAPK (*Mitogen Activated Proteins Kinases*), también denominadas quinasas reguladas por señales extracelulares o ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinases*) son rutas de transducción de señales muy conservadas en organismos eucariotas caracterizadas por un módulo de fosforilación integrado por tres quinasas que actúan de manera secuencial. A la primera de estas proteínas se le denomina MAPKKK (MAP quinasa-quinasa-quinasa), una vez activada fosforila a la MAPKK (MAP quinasa-quinasa), la cual a su vez fosforila a la MAPK (MAP quinasa) (Robinson y Cobb, 1997). Las proteínas MAPKKK tienen un dominio regulador en la región amino terminal y un dominio proteína quinasa en la región carboxilo terminal (Cairns et al., 1992), cuando éstas son activadas en respuesta a una señal, fosforilan a la MAPKK en dos residuos (serina y treonina) de un dominio conservado presente en su región amino terminal, esto produce la activación de la MAPKK, que una vez activa fosforila a la MAPK en una treonina y una tirosina separadas por un solo residuo (TXY). Estas fosforilaciones producen un cambio conformacional que convierte a la proteína en una quinasa activa (Errede et al., 1993; Gartner et al., 1992).

La señal que lleva a la activación de la MAPKKK, es percibida por una variedad de receptores de membrana que trasladan la señal al primer efector perteneciente al grupo de las proteínas G. Normalmente las cascadas MAPK tienen como proteínas diana factores de transcripción que son finalmente, los que generan una respuesta específica (Fig. 4). Aunque, también se han identificado una variedad de proteínas diana que incluyen reguladores de la traducción, proteínas del citoesqueleto, otras quinasas y fosfatasas que en su conjunto permiten controlar procesos tan vitales como la proliferación, diferenciación y muerte celular (Chang and Karin, 2001; Chen and Thorner, 2007). Otro aspecto fundamental es con frecuencia la utilización de componentes comunes a dos vías de transmisión de señal. Sin embargo, la utilización de elementos comunes no impide la especificidad de la respuesta. Uno de los mecanismos que aseguran la linealidad de la activación son las proteínas andamio. Estas proteínas no solo sirven de soporte para mantener unidas las MAP quinasas integrantes del módulo de fosforilación, sino que

regulan de varias formas la señalización (Dard y Peter, 2006; Pearson et al., 2001).

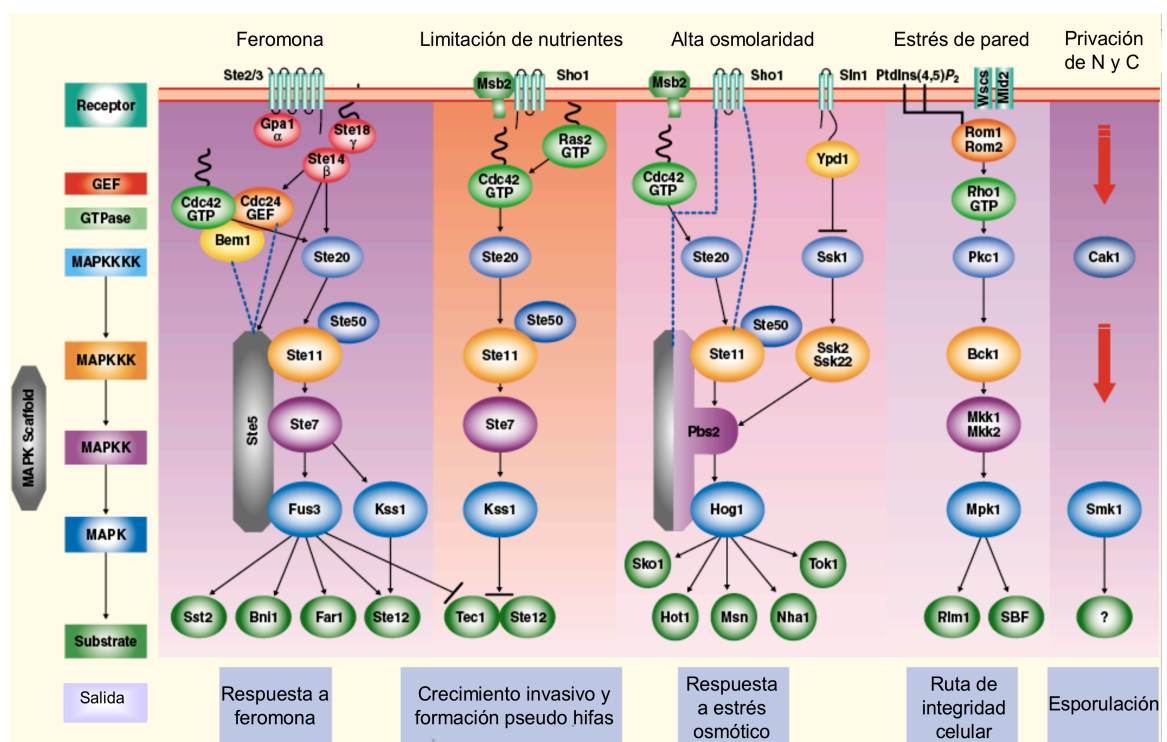


**Figura 4. Esquema de una cascada MAPK.** Estas vías de señalización constan en todos los casos de un modulo central MAPK (MAPKKK, MAPKK y MAPK). Un receptor se activa en respuesta a una señal extracelular la cual lleva a la activación del modulo MAPK mediante la activación de una proteína G. Finalmente la MAPK activa, fosforila varios sustratos entre ellos los más comunes son factores de transcripción, resultando en una alteración del patrón de expresión de la célula.

Las rutas MAPK se han caracterizado exhaustivamente en *Saccharomyces cerevisiae*, un modelo de levadura no patógena. Se conocen cinco rutas MAPK involucradas en distintos procesos que se activan respectivamente por feromona sexual (ruta de apareamiento de la MAPK Fus3); por limitación de nutrientes (ruta de crecimiento invasivo y formación de pseudohifas, controlada por la MAPK Kss1); por alta osmolaridad (ruta de respuesta a estrés osmótico, controlada por Hog1); por agresión a la pared celular (ruta de integridad celular, controlada por Slt2) y por privación de nitrógeno y carbono, que activa

el proceso meiótico y conduce a esporulación (controlada por Smk1) (Chen y Thorner, 2007) (Fig. 5).

En *Schizosaccharomyces pombe* y en otros hongos filamentosos se han caracterizado tres cascadas MAPK (Monge et al., 2006; Xu, 2000) que se conocen como: la ruta de respuesta a estrés (controlada por Sty1, el ortólogo de Hog1 de *S. cerevisiae*); la ruta de respuesta a feromona (controlada por Spk1, ortólogo de Fus3) y la ruta de integridad celular (controlada por Pmk1, ortólogo de Slt2) (Toda et al., 1996).



**Figura 5. Diagrama de las rutas de señalización MAPK descritas en *S. cerevisiae*.** Figura adaptada de (Qi and Elion, 2005).

## 5. Ruta de integridad celular

En muchos hongos patógenos de plantas como *U. maydis* (Ubc3/Kpp2; Mayorga y God, 1999; Muller et al., 1999), *Magnaporthe grisea* (Pmk1; Xu, 2000), *Fusarium oxysporum* (Fmk1; Di Pietro et al., 2001) y *Claviceps purpurea* (Cpmk1; Mey et al., 2002), la llamada ruta de apareamiento y respuesta a feromona (controlada por una MAP quinasa ortóloga de Fus3 de *S. cerevisiae*) ha sido la mas estudiada en relación a la patogénesis.

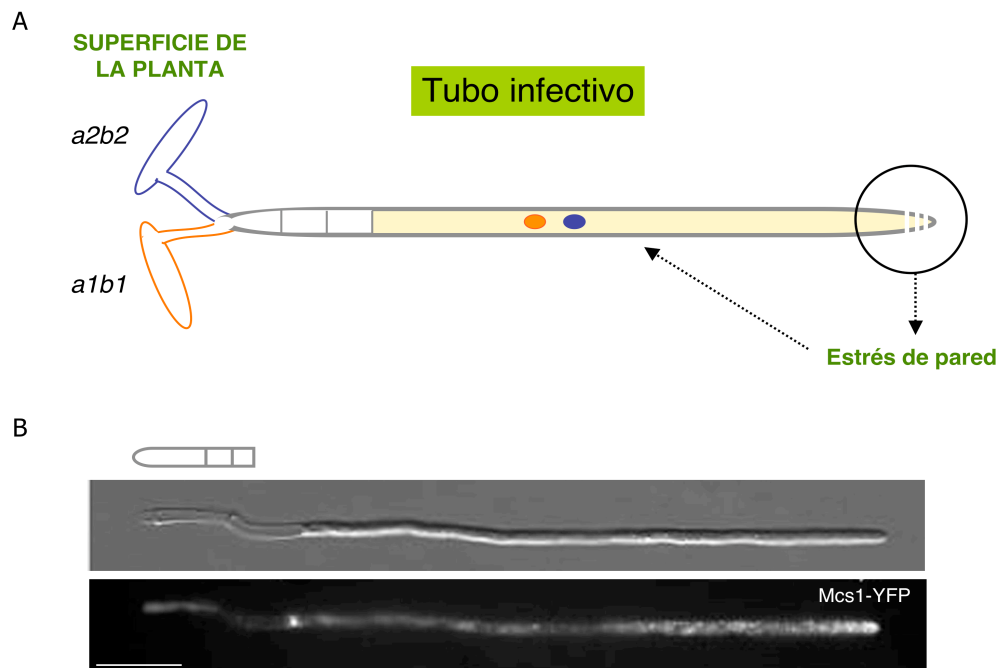
Sin embargo, otra ruta MAPK menos estudiada y que también se ha relacionado con la virulencia tanto en patógenos animales como de plantas es la ruta de integridad celular (Diez-Orejas *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998; Mey *et al.*, 2002). Esta ruta es activada en respuesta a una gran variedad de estímulos externos que provocan un estrés sobre la pared celular regulando la biogénesis de la misma en períodos de crecimiento polarizado de las células (Levin, 2005).

Las proteínas integrantes del módulo MAPK son necesarias para el crecimiento celular en condiciones de estrés térmico, ya que la señal se activa a elevadas temperaturas (Kamada *et al.*, 1995; Navarro-Garcia *et al.*, 1995; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997) y en general la pérdida de función de cualquiera de los componentes de la cascada se asocia con la lisis celular a altas temperaturas a menos que se crezcan con un osmoprotector como el sorbitol.

Dada la dinámica de remodelación continua de la pared celular, se ha sugerido que cualquier tratamiento o efecto que altere la estructura de la misma es suficiente para activar la ruta de integridad celular. Agentes que interfieren en la síntesis de pared como el Calcoflúor, Rojo congo y enzimas líticas (zimoliasas) estimulan la ruta (de Nobel *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006). Además de los agentes específicos que dañan la pared celular, la ruta de integridad es capaz de activarse en respuesta a otras drogas como clorpromazina o cafeína y en respuesta a un estrés osmótico u oxidativo (Barba *et al.*, 2008; Levin, 2005).

En *U. maydis* la transición a la fase patogénica comienza con la formación de un tubo infectivo prolongado. Para mantener esta estructura la célula necesita de la inducción de un fuerte crecimiento polar que se concentra en el ápice del filamento. Por lo tanto, es allí donde se necesitan las enzimas biosintéticas de la pared. De las ocho quitina sintasas descritas en *U. maydis*, cuatro de ellas se localizan en las zonas de crecimiento y de éstas Chs6, Chs7 y Mcs1 tienen un papel importante en virulencia (Weber *et al.*, 2006). El crecimiento sostenido conlleva una reestructuración rápida de la pared celular que probablemente genere estrés de pared. Es en este contexto donde la ruta

de integridad celular se presenta como una posible vía de señalización capaz de activarse y colaborar en el mantenimiento de este proceso (Fig. 6).



**Figura 6. Tubo infectivo. A.** Diagrama representativo de la dinámica de la pared celular del filamento dicarionte durante la etapa de exploración sobre la superficie de la planta. El tubo infectivo crece apicalmente sin que tenga lugar ninguna división celular. Por lo cual el volumen citoplasmático es una limitación al crecimiento. Para hacer frente a este problema y poder abarcar grandes distancias *U. maydis* crece, dejando vacuolas vacías en el extremo basal. **B.** Imagen microscópica de un tubo infectivo de *U. maydis* que muestra la señal proveniente de la fusión quitina sintasa Mcs1 y la proteína con fluorescencia amarilla (YFP) concentrada en el ápice del filamento. Barra corresponde 10µm (Weber *et al.*, 2006).

Por otra parte, la pared celular en los hongos tiene una función protectora y agresiva. Da protección porque confiere rigidez mecánica, soporte estructural y actúa como una primera barrera en contacto con el ambiente. Pero al mismo tiempo es agresiva porque es portadora de los componentes necesarios para la invasión. Es quizás en la superficie celular y en las proteínas que la célula secreta al exterior, donde radican las claves de la interacción planta-patógeno. Dada la importancia biológica de esta estructura, una ruta involucrada en la biogénesis de la pared podría ser relevante en el proceso de patogénesis en *U. maydis*. Por lo cual, el propósito de nuestro trabajo fue caracterizar la ruta de integridad celular en *U. maydis*.

Como mencionamos anteriormente donde mas se ha estudiado esta ruta es en *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo cual, la hemos utilizado como modelo de

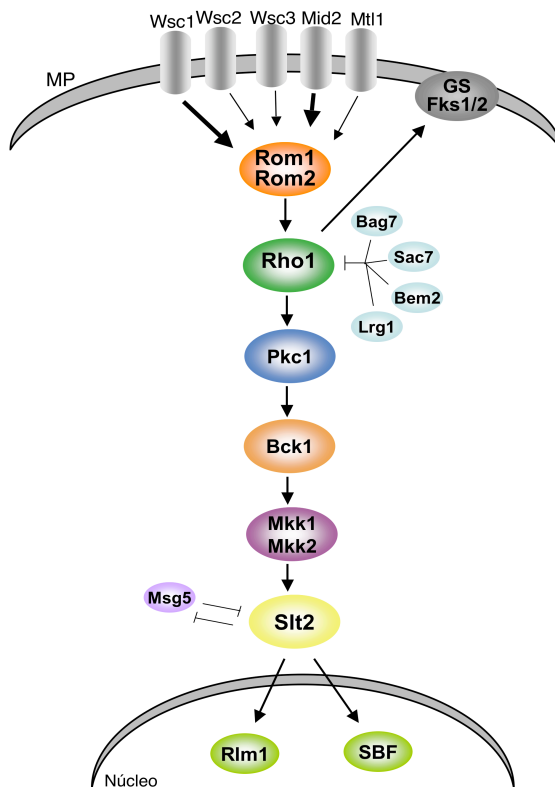
trabajo. En los párrafos siguientes describiremos los componentes y las funciones principales de la ruta de integridad en esta levadura.

## 6. Ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*

### 6.1 Componentes

Esta ruta de señalización esta compuesta por una familia de receptores de membrana acoplados a una proteína G monomérica Rho1, que activa a la proteína quinasa C (Pkc1), que a su vez activa un módulo MAPK formado por Bck1 (MAPKKK), Mkk1 y Mkk2 (dos MAPKK redundantes) y Slt2/Mpk1 (MAPK) (Fig. 7).

Los receptores de membrana Wsc1-3, Mid2 y Mtl1, son proteínas integradas en la membrana citoplasmática, poseen un dominio hidrofóbico en su extremo N-terminal (péptido señal), seguido de un dominio cisteína, una zona rica en serinas y treoninas, un dominio transmembrana y un extremo C-terminal citoplasmático. El papel fundamental de estas proteínas es el de detectar alteraciones en la cubierta externa de las células y transmitir la señal al primer efector, la proteína Rho1.



**Figura 7. Esquema de la Ruta de Integridad Celular en *S. cerevisiae*.** La señal se inicia en la membrana plasmática (MP) cuando los receptores Wsc1-3, Mid1 y Mtl1 detectan cambios a nivel de la envoltura celular y lo transmiten a través de la proteína G Rho1, que es activada principalmente por la proteína GEF Rom2. Las aportaciones relativas de cada receptor se indica mediante el grosor de las flechas. Rho1 activa la proteína quinasa Pkc1, la cual transmite dicha señal a un módulo MAPK constituido por Bck1, Mkk1/2 y Slt2. Una vez activa Slt2, induce la respuesta transcripcional mediada por Rlm1 y SBF. Figura adaptada de Levin (2005).



La GTPasa Rho1, como los restantes miembros de la superfamilia Ras (Cabib et al., 1998) funciona como un interruptor molecular ciclando entre un estado inactivo, en el que se encuentra unida a GDP, y un estado activo en el que se halla unida a GTP. El intercambio GDP por GTP esta modulado por tres tipos de proteínas reguladoras. Los factores de intercambio de nucleótidos (GEFs), las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) y las proteínas inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs). Las GEFs catalizan la liberación de GDP de la GTPasa y estabilizan transitoriamente la proteína G en su estado libre de nucleótido. La unión de GTP a la proteínas G permite la liberación de la GEF en su forma activa, la cual queda disponible para comenzar una nueva ronda de activación. Las proteínas GAPs estimulan la actividad GTPasa de las proteínas Rho, quienes en su forma inactiva unida a la forma GDP puede interaccionar con inhibidores GDIs (Gulli y Peter, 2001; Schmidt *et al*, 2002) La actividad de Rho1 esta mediada principalmente por una activación local de las GEFs Rom1 y Rom2 y por una inactivación debido a la acción de las proteínas GAPs (Sac7, Bem2, Bag7 y Lrg1). Se han identificado dos funciones esenciales para Rho1. Una de ellas es su papel fundamental en el proceso de síntesis de la pared celular a través de la activación de las dos subunidades catalíticas de la  $\beta$ -1,3 glucano sintasa, Fks1 y Fks2 (Drgonova et al., 1996; Cabib *et al.*, 1998). La otra función esencial de Rho1 es la activación de la proteína quinasa Pkc1 (Kamada et al., 1995).

Rho1 y Pkc1, tienen un papel esencial en el progreso de la señal a través de la ruta de integridad celular, pero igualmente participan en reacciones colaterales y alcanzan una notable distribución en distintas localizaciones celulares (Andrews y Stark, 2000; Denis y Cyert, 2005). La activación de Pkc1, resultante de la generación del estímulo, determina la activación del módulo MAPK.

La activación de Bck1 (MAPKKK) comienza una cadena de fosforilaciones secuenciales que culmina con la fosforilación de la MAP quinasa Slt2, que determina la respuesta celular propiamente dicha. Las dianas mejor establecidas, como sustratos de fosforilación por parte de Slt2, son dos factores de transcripción situados en el núcleo, Rlm1 y SBF (Swi4/Swi6) (Fig. 7). Por

otra parte se han descrito posibles dianas citoplasmáticas de Slt2 sugiriendo una multiplicidad de funciones de dicha proteína.

Slt2 se localiza predominantemente en el núcleo durante todas las fases del ciclo celular, mientras que Mkk1 y Mkk2 están dispersas por todo el citoplasma. Sin embargo, estas proteínas se acumulan en sitios de crecimiento polarizado activo durante la aparición de la gema y en la zona apical de la prolongación del *shmoo* en respuesta a feromona. Esta localización es dependiente de la proteína Spa2 (van Drogen y Peter, 2002). Por otra parte, se ha visto que Spa2 interacciona con Mkk1/2 y Slt2 en un estudio de doble híbrido, lo que sugiere que Spa2 actúa como andamiaje para estas proteínas quinasas (Sheu et al., 1998; van Drogen y Peter, 2002).

## **6.2 Dianas de acción de la MAP quinasa Slt2**

### **6.2.1 Dianas nucleares**

Una consecuencia de la estimulación de la ruta de integridad es la activación del factor de transcripción Rlm1 (Dodou y Treisman, 1997; Watanabe et al., 1995). Una búsqueda de genes regulados en respuesta a estrés de pared celular reveló que Rlm1 regula la expresión de 25 genes, la mayoría de los cuales codifica para proteínas relacionadas con la biogénesis de la pared celular (Jung and Levin, 1999; Jung et al., 2002). El mutante  $\Delta rlm1$  no es sensible a un aumento de la temperatura y muestra sensibilidad a cafeína. (Levin, 2005).

El otro factor de transcripción propuesto como diana de la ruta de integridad celular es el complejo SBF, cuya regulación dependiente de esta cascada, no es del todo clara. SBF está formado por la subunidad reguladora Swi6 y una proteína de unión a ADN Swi4 (Breedon, 2003). Este factor de transcripción se activa en la transición G1/S regulando entre otros la expresión de los genes propios de la fase G1 del ciclo celular (Moffat y Andrews, 2004). Además de esta función, existen evidencias genéticas y bioquímicas que sugieren la implicación de Slt2 en la regulación de SBF en respuesta a un estrés de pared celular. Se ha observado que la lisis celular dependiente de la temperatura elevada en el mutante  $\Delta slt2$  es suprimida por la sobreexpresión de Swi4 pero no de Swi6 (Igual et al., 1996; Madden et al., 1997). Otra evidencia

que relaciona a SBF con la biogénesis de la pared celular es que tanto el mutante nulo  $\Delta Swi4$  como el mutante  $\Delta Swi6$  muestran una hipersensibilidad al calcoflúor (Igual et al., 1996). Por otra parte, Swi6 es fosforilado *in vitro* por Slt2 e *in vivo* por un estrés en la pared celular (Madden et al., 1997). Además, Slt2 se asocia con SBF *in vivo* a juzgar por los experimentos de coimmunoprecipitación. Sin embargo, Slt2 interacciona únicamente con Swi4 (y no con Swi6) *in vitro*. Esta y otras observaciones llevaron a proponer un modelo donde el dímero Swi4/Slt2 podría regular la expresión de ciertos genes relacionados con la biogénesis de la pared en ausencia de Swi6 (Beatz et al., 2001). Recientemente se ha sugerido que la activación de la ruta de integridad celular dirige la expresión de Fks2 (subunidad de la glucano sintasa) a través de SBF por un mecanismo no catalítico. Es decir, aunque Slt2 deba de estar fosforilada para promover la transcripción, su actividad quinasa es dispensable (Kim et al., 2008).

### 6.2.2 Dianas citoplasmáticas

Entre las dianas citoplasmáticas de Slt2, encontramos el sistema de alta afinidad de captura de  $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática compuesto por dos subunidades, Cch1 y Mid1. La activación del canal Cch1-Mid1 conduce a la acumulación de  $Ca^{2+}$  intracelular y a la activación de la calcineurina (Locke et al., 2000). Se ha observado que Slt2 activa Cch1 y Mid1 en respuesta a un estrés en la pared celular (Alberts et al., 1998). Además, la cascada Slt2-MAPK es necesaria para activar los canales Cch1-Mid1 en respuesta al estrés en el retículo endoplasmático (Bonilla y Cunningham, 2003).

Slt2 fosforila a Msg5 en respuesta a la activación de la ruta de integridad celular (Flandez et al., 2004). Msg5 es una fosfatasa específica de MAPKs, que se encarga de quitar los fosfatos de los residuos treonina y tirosina del motivo TXY. Flandez et al (2004), han demostrado que Msg5 se une a Slt2 fosforilada y la inactiva, recíprocamente Slt2 fosforila Msg5 como consecuencia de su activación y esta fosforilación disminuye la afinidad de la interacción entre ambas proteínas.

Estudios recientes proponen a las propias MAPKKs (Mkk1/Mkk2) de la ruta de integridad celular como dianas de Slt2 (la MAPK), sugiriendo la existencia de un complejo mecanismo de regulación por retroalimentación a este nivel (Jimenez-Sanchez et al., 2007).

### **6.2.3 Efecto sobre el ciclo celular**

Las primeras evidencias de la relación del ciclo celular y la ruta de integridad viene de la observación de que el doble mutante *slt2 cdc28*, presenta defectos aditivos sobre el crecimiento celular con respecto a los mutantes simples (Mazzoni et al., 1993). En este trabajo los autores concluyen que la función de Slt2 es aguas abajo o en paralelo al proceso de emergencia de la gema dirigido por Cdc28.

Un trabajo posterior reveló que existía una activación periódica de la ruta de integridad dependiente del ciclo celular, con un pico de actividad que coincide con la aparición de la gema, donde el crecimiento polar es máximo (Zarzov et al., 1996). También existe activación de la ruta asociada al crecimiento polar durante el proceso de apareamiento. Esta activación de la ruta en relación al ciclo celular tiene sentido desde la perspectiva de la necesidad de remodelación de la pared durante las distintas fases del ciclo. Así, durante la formación de la gema (fase G1/S) el crecimiento polarizado genera estrés de la pared en el punto donde se concentra y es en este momento donde las células son mas vulnerables a la lisis. Por el contrario, durante la fases G2 y M el crecimiento celular pasa a ser isotrópico. Y efectivamente la pérdida de función de *pkc1* a temperaturas restrictivas, detiene el crecimiento de las células con gemas pequeñas y no en otras fases del ciclo celular (Levin, 2005).

Por otra parte, una perturbación del citoesqueleto de actina como consecuencia de un cambio en la temperatura o bien por la acción de agentes químicos como latrunculina (un inhibidor de la polimerización de actina) provocan la activación de la ruta de integridad celular (Harrison et al., 2001). El mecanismo molecular de esta activación no se conoce, pero esta implicado en un "punto de control" (*checkpoint*), que produce una parada del ciclo celular en G2 hasta que la polaridad de la actina se restablece. Harrison et al., (2001)

sugieren que Slt2 es necesario para desencadenar la parada en G2 durante este *checkpoint*, mediante la inhibición de la fosfatasa Mih1 (homólogo a Cdc25 en *S. cerevisiae*). Mih1 es la fosfatasa encargada de revertir la fosforilación inhibitoria mantenida por Swe1. Con la pérdida de función de Mih1, la acción de Swe1 es suficiente para mantener inhibido el complejo Cdc28/Clb, previniendo la entrada en mitosis hasta resuelto el problema. Sin embargo, el mecanismo por el cual Slt2 bloquea la acción de Mih1 se desconoce. Además, en este mismo trabajo proponen que tanto Rlm1 como Swi4 o ambos, son dispensables para la inducción de la parada en G2.

Todas estas observaciones sugieren una relación entre la ruta de integridad celular y la maquinaria del ciclo celular, aunque hasta el momento dicha conexión no se conoce en detalle.

La regulación del ciclo celular es una de las respuestas de adaptación más importantes para la supervivencia celular frente a un estrés. Mecanismos similares de control, donde las células enfrentadas a estrés inducen mediante la activación de una cascada MAPK una parada del ciclo celular, son comunes tanto en levaduras como en mamíferos. Así, un choque hiperosmótico produce una activación de Hog1 y una parada transitoria del ciclo celular tanto en fase G1 como en G2. Al parecer la respuesta celular es más eficiente y segura de ejecutar cuando la célula no está en una fase vulnerable como lo es la replicación (fase S) ó en mitosis. El control sobre la progresión del ciclo celular se consigue a través de la modulación de varios elementos, siguiendo distintas estrategias: estabilización de inhibidores, control transcripcional sobre las ciclinas y cambios en la localización de proteínas claves (Clotet y Posas, 2007; Chen y Thorner, 2007). En mamíferos la MAP quinasa activada por estrés, p38 se activa en respuesta a un estrés osmótico y modula la progresión del ciclo celular. Aunque, falten elucidar varios aspectos de la regulación, básicamente se propone, la modulación de la expresión de las ciclinas y la acción sobre reguladores de ciclo celular como mecanismos de control. Lo que advierte sobre la conservación de los mecanismos (Zapater et al., 2005).





## Objetivos



Con los antecedentes comentados en la sección anterior nos planteamos los siguientes objetivos en este trabajo:

1. Caracterizar la ruta de integridad celular en *Ustilago maydis* utilizando como modelo de partida la ruta de *S. cerevisiae* que es donde mejor se conoce.
2. Estudiar la posible relación entre la ruta de integridad celular y el proceso de patogénesis en *Ustilago maydis*.

## Objetivos





## 1. Estirpes y plásmidos

El presente trabajo se desarrolló utilizando distintas estirpes de *Ustilago maydis* cuyas características genéticas mas relevantes, así como su procedencia, se recogen en la tabla 1. Para la construcción de plásmidos recombinantes se usó la estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (Tabla 2).

**Tabla 1.** Características genéticas de las estirpes de *U. maydis*

Estirpes	Genotipo	Origen	Referencia
FB1	<i>a1b1</i>	521x518	Banuett y Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2b2</i>	521x518	Banuett y Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1 mfa2 bE1bW2</i>	FB1	Bölker <i>et al.</i> , 1995
UMA1	<i>a1b1 <math>\Delta bck1</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA2	<i>a1b1 <math>\Delta mkk1</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA2.2	<i>a2b2 <math>\Delta mkk1</math></i>	FB2	Este trabajo
UMA3	<i>a1b1 <math>\Delta slt2</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA4	<i>a1b1 <math>\Delta bck1 \Delta mkk1</math></i>	UMA1	Este trabajo
UMA5	<i>a1b1 <math>\Delta bck1 \Delta slt2</math></i>	UMA1	Este trabajo
UMA6	<i>a1b1 <math>\Delta mkk1 \Delta slt2</math></i>	UMA2	Este trabajo
UMA8	<i>a1b1 <math>\Delta bck1 \Delta mkk1 \Delta slt2</math></i>	UMA1	Este trabajo
UMA44	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 pHA-slt2</math></i>	UMA3	Este trabajo
UMA44.2	<i>a1b1 <math>\Delta bck1 pHA-slt2</math></i>	UMA1	Este trabajo
UMA44.3	<i>a1b1 <math>\Delta mkk1 pHA-slt2</math></i>	UMA2	Este trabajo
UMA59	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 pHA-slt2^{AEF}</math></i>	UMA3	Este trabajo
UMA60	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 pHA-slt2^{KD}</math></i>	UMA3	Este trabajo
UMA7	<i>a1b1 <math>P_{crg1}:mkk1^{DD}</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA12	<i>a1b1 <math>P_{crg1}:mkk1</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA57	<i>a1b1 <math>\Delta bck1 P_{crg1}:mkk1^{DD}</math></i>	UMA1	Este trabajo
UMA9	<i>a1b1 <math>\Delta mkk1 P_{crg1}:mkk1^{DD}</math></i>	UMA2	Este trabajo
UMA13	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 P_{crg1}:mkk1^{DD}</math></i>	UMA3	Este trabajo
UMA20	<i>a1b1 <math>mkk1^{DDcrg1}</math></i>	FB1	Este trabajo
UMA42	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 mkk1^{DDcrg1}</math></i>	UMA20	Este trabajo
UMA43	<i>a1b1 <math>\Delta slt2 mkk1^{DDcrg1} pHA-slt2</math></i>	UMA42	Este trabajo

Estirpes	Genotipo	Origen	Referencia
UMA64	<i>a1b1Δslt2 mkk1<sup>DDcrg1</sup> pHA-slt2<sup>AEF</sup></i>	UMA42	Este trabajo
UMA65	<i>a1b1Δslt2 mkk1<sup>DDcrg1</sup> pHA-slt2<sup>KD</sup></i>	UMA42	Este trabajo
UMA54	<i>a1b1 mkk1<sup>DDcrg1</sup> P<sub>crg1</sub>:NLS-GFP</i>	UMA20	Este trabajo
UMA55	<i>a1b1 Δrlm1</i>	FB1	Este trabajo
UMA77	<i>a1b1 Δrlm1 P<sub>crg1</sub>:mkk1<sup>DD</sup></i>	UMA7	Este trabajo
UMA16	<i>a1b1 Δrcl1</i>	FB1	Este trabajo
UMA17	<i>a1b1 Δrcl2</i>	FB1	Este trabajo
UMA18	<i>a1b1 Δrcl1 P<sub>crg1</sub>:mkk1<sup>DD</sup></i>	UMA16	Este trabajo
UMA82	<i>a1b1 mkk1<sup>DDcrg1</sup> cdc25-3GFP</i>	UMA20	Este trabajo
MUM72	<i>a1b1 cdc25-3GFP</i>	FB1	Mielnichuk y Pérez-Martín, 2008
UMC48	<i>a1b1 P<sub>crg1</sub>:wee1-myc</i>	FB1	Sgarlata y Pérez-Martín, 2005b
UMA79	<i>a1b1 mkk1<sup>DDcrg1</sup> P<sub>crg1</sub>:wee1-myc</i>	UMA20	Este trabajo
UMC27	<i>a1b1 cdc25<sup>nar1</sup></i>	FB1	Sgarlata y Pérez-Martín, 2005a
UMA56	<i>a1b1 cdc25<sup>nar1</sup> P<sub>crg1</sub>:mkk1<sup>DD</sup></i>	UMC27	Este trabajo
UMA25	<i>a1b1 Δspa2</i>	FB1	Este trabajo
UMA36	<i>a1b1 spa2-GFP</i>	FB1	Este trabajo
UMA30	<i>a1b1 Δslt2 pGFP-slt2</i>	UMA3	Este trabajo
UMA49	<i>a1b1 mkk1-GFP</i>	FB1	Este trabajo
UMA67	<i>a1b1 P<sub>crg1</sub>:T7rho2<sup>QL</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA68	<i>a1b1 P<sub>crg1</sub>:T7rho3<sup>QL</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA69	<i>a1b1 P<sub>crg1</sub>:T7rho4<sup>QL</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA76	<i>a1b1 P<sub>crg1</sub>:T7rho1<sup>QL</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA74	<i>a1b1 T7-rho2<sup>nar</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA75	<i>a1b1 T7-rho4<sup>nar</sup></i>	FB1	Este trabajo
UMA80	<i>a1b1 T7-rho1<sup>nar</sup></i>	FB1	Este trabajo
SONU133	<i>a1b1 Δpkc1</i>	FB1	Colección laboratorio
UMA81	<i>a1 mfa2 bE1bW2 Δmkk1</i>	SG200	Este trabajo

**Tabla 2.** Plásmidos

<b>Vectores utilizados</b>	<b>Procedencia</b>
pUMa260	Brachmann <i>et al.</i> , 2004
pUMa261	Brachmann <i>et al.</i> , 2004
pUMa262	Brachmann <i>et al.</i> , 2004
pPRU11	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
pRU11-Hyg	Colección del laboratorio
pRU11-T7	Colección del laboratorio
pRU2-T7	Colección del laboratorio
pGem-HA	(Craven <i>et al.</i> , 1998)
pGem-GFP	(Craven <i>et al.</i> , 1998)
pMFS-3n	Colección del laboratorio
pRU11-Wee1-myc	Sgarlata y Pérez-Martín, 2005b
pGEMT easy vector	PROMEGA
pUMa-Slt2	Este trabajo
pUMa-HASlt2	Este trabajo
pRU11-Mkk1	Este trabajo
pRU11-Mkk1 <sup>DD</sup>	Este trabajo
pRU11Hyg-Mkk1 <sup>DDcrg1</sup>	Este trabajo
pRU11-T7Rho1 <sup>QL</sup>	Este trabajo
pRU11-T7Rho1	Este trabajo

## **2. Medios y condiciones de cultivo**

### **2.1 Medios y condiciones generales**

Las estirpes de *U. maydis* se cultivaron en medios ricos, definidos o pobres según las características de crecimiento de la estirpe y del experimento. Como medio de cultivo rico y definido se utilizaron las recetas descritas por Holliday (1974) y Kaiser *et al.* (1994). Los medios mínimos o pobres, que podían contener nitrato (MMNO<sub>3</sub>) o amonio (MMNH<sub>4</sub>) como fuente de nitrógeno, se prepararon siguiendo la receta descrita por Alfa *et al.* (1993). En todos los casos se utilizó glucosa (D) o arabinosa (A) como fuente de carbono al 1%. En medio líquido, las estirpes de *U. maydis* fueron crecidas a 28°C en

agitación a 250 r.p.m. y en buenas condiciones de aireación (el volumen ocupado no era más de 1/5 del volumen total del recipiente utilizado). Las placas con medio sólido se incubaron en una estufa a 28°C.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó la receta de Luria-Bertoni (Sambrook et al., 1989). De forma rutinaria las cepas se cultivaron a 37°C y se utilizó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo se prepararon con agua Milli-Rho.

## 2.2 Medios y soluciones para el crecimiento de *U. maydis*

**YEP (Medio rico)**\_ 1% extracto de levadura (Difco), 2% bactopectona (Difco). YPD: fuente de carbono glucosa. YPA: fuente de carbono arabinosa

**CM (Medio definido)**\_ 0,25% casaminoácidos (Difco), 0,1% extracto de levadura (Difco), solución de vitaminas y sales (Holliday, 1974), 0,15% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, pH 7,0 y 1% fuente de carbono.

CMD: fuente de carbono glucosa. CMA: fuente de carbono arabinosa.

**MM (Medio mínimo)**\_ 0,3% KNO<sub>3</sub>, 6,25% solución de sales (Holliday, 1974), pH 7,0 y 1% fuente carbono.

**Agar de regeneración**\_ 1% extracto de levadura, 2% bactopectona (Difco), 18,22% sorbitol (Sigma, S-1876), 1,5% agar y 1% fuente de carbono.

**Solución de sales**\_ 16‰ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4‰ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8‰ KCl, 4,08‰ MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,32‰ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O y 8‰ Elementos traza.

**Elementos traza**\_ 0,06‰ ácido bórico, 0,14‰ MnCl·4H<sub>2</sub>O, 0,4‰ ZnCl<sub>2</sub>, 0,4‰ Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,1‰ FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0,04‰ CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O.

**Solución de vitaminas**\_ 0,1‰ Tiamina, 0,05‰ Riboflavina, 0,05‰ Piridoxina, 0,2‰ Ácido Ca-Pantoteico, 0,05‰ Ácido aminobenzoico, 0,2‰ Ácido nicotínico, 0,2‰ Cloruro de colina y 0,1‰ mio-inositol (Sigma).

## 2.3 Regeneración y selección de transformantes

Para regenerar protoplastos se utilizó agar de regeneración (Schulz et al., 1990) con sacarosa como fuente de carbono salvo en el caso de genes esenciales bajo la regulación del promotor *Pcrg1*, donde se utilizó arabinosa



como fuente de carbono. Para la selección de los transformantes se utilizaron los siguientes antibióticos: carboxina, 2 µg/ml; higromicina, 200 µg/ml o nourseotricina 150 µg/ml. En las placas de regeneración se utilizaron al doble de concentración.

## **2.4 Ensayos de apareamiento y formación de filamentos**

Para los ensayos de apareamiento se utilizaron placas de PD-charcoal (Holliday, 1974) puesto que sobre este medio las estirpes compatibles o solopatógenicas pueden realizar los procesos de apareamiento y de formación de filamentos que ocurren sobre la superficie vegetal. Para realizar el ensayo se crecieron las estirpes hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,5, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se mezclaron y se sembraron con sus controles correspondientes. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a temperatura ambiente de 24 a 48 horas.

## **2.5 Diluciones seriadas**

Las diluciones se realizaron en medio sólido . Se tomó 1 ml de cultivo a D.O.<sub>600nm</sub> 0,8-1, crecidas en YPD y se hicieron 4 diluciones seriadas en H<sub>2</sub>O ó medio (1/10). Finalmente se sembraron 2 µl de cada dilución en las placas de YPD, YPA, YPD con la adición de: 50µM calcoflúor (CFW), 15µg/ml rojo congo (RC), 0,005% SDS, 50µM clorpromazine (CPZ), 1,5mM cafeína, 1M KCl, 0,2M CaCl<sub>2</sub>, 1M sorbitol y 3M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **2.6 Promotores regulables y constitutivos en *U. maydis***

Para los experimentos de expresión regulada se utilizaron los promotores *Pcrg1* inducible con arabinosa y reprimible con glucosa (Bottin et al., 1996), y *Pnar1* inducible con nitrato y reprimible con amonio o medio CM o YEP (Brachmann et al., 2001). Para los experimentos de inducción, se crecieron células en medio represor hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,8-1, se lavaron con agua destilada estéril tres veces y luego se transfirieron a medio inductor ajustando la D.O.<sub>600nm</sub> a 0,2. Para los experimentos de represión, se crecieron células en

medio inductor y luego se transfirieron al medio represor. El tiempo de inducción / represión se detalla en cada experimento.

### **3. Metodologías genéticas**

#### **3.1 Construcción de plásmidos recombinantes**

La extracción de ADN plasmídico procedente de *E. coli*, la digestión de ADN mediante el uso de enzimas endonucleasas, el tratamiento con fosfatasa alcalina, los análisis electroforéticos, la purificación de fragmentos de ADN y la ligación de fragmentos para la construcción de plásmidos recombinantes se realizaron según los métodos descritos por Ausubel et al. (1997). Las células competentes de *E. coli* se transformaron con plásmidos purificados o mezclas de ligación mediante el método de choque térmico descrito por Hanahan (1983).

#### **3.2 Reacciones de amplificación**

La reacción de amplificación con la ADN polimerasa termosensible se realizó en un termociclador. Las reacciones contenían 500nM de cada oligonucleótido, 10 ng de ADN molde, 200 µM de cada dNTP y 1 unidad activa de polimerasa en 50 µl de solución tamponada. El tiempo de elongación se ajustó según la longitud del fragmento a amplificar y la temperatura de anillado en función de los oligonucleótidos utilizados. Para amplificaciones de alta fidelidad se utilizaron las polimerasas Pwo (Roche) o Expand Long Template (Roche), mientras que para el resto de las amplificaciones se usó la polimerasa Taq.

#### **3.3 Extracción de ADN genómico de *U. maydis***

La extracción de ADN genómico de *U. maydis* se realizó según el protocolo de Hoffman y Winston (1987). Según este protocolo, las células se lisaron por ruptura mecánica con tampón de lisis (10 mM tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton) y el ADN se extrajo con una solución

de fenol:cloroformo. Finalmente el ADN se resuspendió en 50-100 µl de tampón TE (10 mM Tris-base, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA·H<sub>2</sub>O) con 50 mg/ml RNasa.

### **3.4 Transformación de *U. maydis***

La transformación de las estirpes de *U. maydis* se realizó según el protocolo descrito por Schulz et al. (1990). En resumen, se utilizaron protoplastos obtenidos por método enzimático basado en el uso del complejo Novozym328. Las células se incubaron con el complejo enzimático en una solución de SCS (1 M sorbitol, 20 mM citrato de sodio pH 5,8, H<sub>2</sub>O Milli-Q) hasta que se volvieron esféricas, se lavaron, se alicuotaron en STC (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O Milli-Q) y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

La transformación se realizó en hielo incubando los protoplastos primero con una mezcla de heparina y ADN linealizado, y a continuación con una solución STC/40% PEG 3350. Finalmente se sembraron en placas de regeneración. Estas placas se prepararon en dos capas, la primera capa fue preparada con antibiótico 2X y la segunda capa fue preparada sin antibiótico, para asegurar la difusión paulatina del antibiótico. Las placas se incubaron a 28°C.

## **4. Metodologías para el tratamiento de proteínas**

### **4.1 Extracción de proteínas de *U. maydis***

La extracción de proteínas de *U. maydis* se realizó por ruptura mecánica de las células con tampón de lisis (125mM Tris-ClH pH 6,8, 1% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 0,005% azul de bromofenol, 20% glicerol, 5mM EDTA pH 8, 1mM PMSF y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de proteasas y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de fosfatasas Roche). Los lisados se incubaron durante 5 minutos a 100°C y se colocaron en hielo para su utilización inmediata o bien se congelaron a -80°C para un uso posterior.

Para realizar las inmunoprecipitaciones, las células se pre-trataron con el complejo Novozym328 para degradar la pared celular (ver Transformación de

*U. maydis*). Luego se realizó una ruptura mecánica suave con el tampón de lisis BF (50mM Tris-HCl pH 7,5, 250mM NaCl, 0,1% Tritón X100, 50mM NaF, 1mM  $\beta$ -glicerolfosfato, 1mM EGTA, 12,5mM pirofosfato de sodio, 0,1mM NaVO<sub>3</sub>, 5mM EDTA pH 8, 1mM PMSF y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de proteasas y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de fosfatasas Roche). Los lisados se trataron como se describe más adelante para su uso inmediato o se congelaron a -80°C para su utilización posterior.

## 4.2 Inmunoprecipitación

Para realizar las inmunoprecipitaciones se utilizó el sistema comercial Dynabeads® (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. En resumen, el extracto proteico se incubó con tampón BF durante 1 hora, luego se agregó un volumen de bolitas magnéticas (resina con Proteína G unida a bolitas magnéticas) y finalmente se incubó 2 horas en agitación suave a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados con tampón BF y se resuspendió en el tampón de lisis descrito anteriormente. Los lisados se incubaron durante 5 minutos a 100°C y se colocaron en hielo para su utilización inmediata o bien se congelaron a -80°C para un uso posterior.

## 4.3 Ensayo quinasa

Para el ensayo quinasa los lisados se obtuvieron según el protocolo descrito anteriormente. Las proteínas fusionadas al epítipo HA se inmunoprecipitaron por adición del anticuerpo  $\alpha$ -[HA] utilizando el sistema comercial Dynabeads® (Invitrogen). Las muestras se lavaron 4 veces con tampón BF y una última vez con el tampón quinasa BK (20mM HEPES pH 7,4, 15mM Cl<sub>2</sub>Mg, 5mM EGTA, 1mM DTT) y se resuspendieron en 20 $\mu$ l de tampón quinasa (KB) conteniendo 50mM  $\beta$ -glicerofosfato, 0,5mM Monovanadato sódico, 50 $\mu$ M ATP, 0,5mg/ml MBP (*Myelin Basic Protein*), 160  $\mu$ Ci/ml  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP, y se incubaron durante 20 minutos a 28°C. La reacción se detuvo por adición de 20 $\mu$ l de tampón de lisis. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%. El gel

seco se expuso en una pantalla (Storage Phosphor Screen, Amersham-Pharmacia Biotech) y se reveló en un detector adecuado (Molecular image®, Bio-Rad).

#### **4.4 Western blot**

Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida del 8 al 10% (Laemmli, 1970) a voltaje constante con Tris-ClH/glicina/SDS (50mM, 400mM, 0,02% respectivamente) como tampón de carrera. El gel se electrotransfirió a una membrana Immobilon-P (Millipore) utilizando el sistema Mini Trans-blot® Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó en un tampón adecuado (48 mM Tris-ClH pH 7,5, 39mM glicina, 0,0375% SDS, 20% metanol) a amperaje constante (0,15 Å por gel) durante 30-45 minutos según el tamaño de la proteína. El bloqueo y los lavados de la membrana se realizaron según el anticuerpo siguiendo la recomendación de la casa comercial. En este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos:  $\alpha$ -[MYC-peroxidasa] (1:10.000, Roche),  $\alpha$ -[PSTAIRE] (1:5.000, Santa Cruz),  $\alpha$ -[HA-peroxidasa] (1:5.000, Roche),  $\alpha$ -[T7-peroxidasa] (1:10.000, Novagen),  $\alpha$ -[MYC] (1:10.000, Roche),  $\alpha$ -[HA] (1:10.000, Roche)  $\alpha$ -fosfo p44/p42 Map Kinasa (1:1000, Cell Signaling),  $\alpha$ -fosfo cdc2 (tyr15) (1:10.000, Cell Signaling), anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:10.000, Roche) y anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:10.000, Roche). Para revelar las membranas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia Western Lighthing Chemiluminiscence Reagent Plus, (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para reutilizar las membranas se limpiaron con un solución 0,1 M glicina, 1% SDS, 0,05% NP-40, pH 2,5 durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se realizaron 3 lavados para quitar el exceso de la solución y se siguió el protocolo desde el bloqueo de la membrana.

### **5. Microscopía**

A continuación se detallan las metodologías utilizadas para la observación de núcleos, septos, microtúbulos y filamentos infectivos. Las muestras se

observaron en microscopio Nikon Eclipse 90i. Las imágenes obtenidas fueron tratadas con los programas Metamorph y Adobe Photoshop.

### **5.1 Tinción de núcleos**

Para la observación de los núcleos se utilizó una solución de DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol) preparada en PBS (0,043 M  $\text{NaPO}_4^3$ , 0,014 M  $\text{KPO}_4^3$ , 0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl). Las muestras se prepararon tomando un pequeño volumen de cultivo que se secó a temperatura ambiente sobre un portaobjetos. Luego se añadió la solución con DAPI a una concentración final de  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  y se colocó el cubreobjetos para la observación al microscopio.

### **5.2 Tinción de septos**

Para la observación de los septos se utilizaron dos tinciones distintas. Una tinción con WGA-FITC (aglutinina de germen de trigo asociada a fluorocromo) preparado en PBS (0,043 M  $\text{NaPO}_4^3$ , 0,014 M  $\text{KPO}_4^3$ , 0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl) o una tinción con calcoflúor preparado en DMSO (dimetil-sulfóxido). Para la tinción con WGA-FITC, que permitía realizar doble tinción con DAPI, las células se lavaron con PBS y luego se resuspendieron en WGA-FITC a una concentración final de  $8\mu\text{g}/\text{ml}$ . A continuación se incubaron 15 minutos con agitación suave en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente las células se volvieron a lavar con PBS y se montaron sobre el portaobjetos. Para la tinción con calcoflúor se mezcló sobre el portaobjetos el cultivo con calcoflúor a una concentración final de 0,2 mg/ml. Luego se eliminó el exceso del compuesto.

### **5.3 Tinción de apresorios**

Se infectaron las plantas y se recogieron a las 16 horas de la inoculación. Se diseccionó la planta para la obtención de las hojas más internas (más jóvenes). Se colocaron en una solución de calcoflúor de 10mg/ml durante 1 minuto. Se lavaron dos veces en agua durante dos minutos. Luego se depositaron en un portaobjetos provisto de un papel adhesivo para la fijación de la hoja y se observó al microscopio.

#### **5.4 Tinción de filamentos dentro de la planta**

Para poder observar los filamentos infectivos en el tejido de la planta, al cabo de 3 días luego de la inoculación se recogieron hojas que tuvieran orificios de la inyección y se incubaron durante 24 horas en etanol 100% para la eliminación de los pigmentos. Se lavó una vez con agua y se trató durante 3-4 horas a 90°C con una solución al 10% de KOH. Posteriormente, se lavó con agua y se incubó en CBE (0,03% Clorazol Black E en una solución de agua, ácido láctico y glicerol a razón 1:1:1). Se destiñeron las hojas con glicerol al 50% para su observación en el microscopio.

#### **5.5 Determinación del Ratio N/C**

La razón entre la intensidad nuclear y citoplasmática de la proteína Cdc25-3GFP se calculó como describe Dunaway et al., (2005). Brevemente, la intensidad de la señal proveniente del núcleo y del citoplasma se determinó comparando la intensidad de los píxeles en un área del núcleo con otra área equivalente en el citoplasma. El ratio se cuantificó para 30 células en cada experimento.

### ***6. Infección de plantas *Zea mays****

Para los ensayos de infección se utilizaron plantas de maíz variedad Gaspar Flint. Las plantas se crecieron en invernadero con temperatura entre 28°C-30°C, humedad entre 60-90% y fotoperíodo de 12 horas. Se infectaron aproximadamente catorce días después de haber sido sembradas mediante la inyección de cultivo (en el caso de estirpes diploides o solopatógenicas) o mezcla de cultivos compatibles (en el caso de estirpes haploides). Se inocularon alrededor de  $10^7$  células/ml en la base del tallo. A partir de los diez días se pudieron observar los síntomas característicos de la infección: clorosis, manchas de antocianina y tumores.

## **7. Análisis in silico de las secuencias**

La búsqueda de las proteínas estudiadas de *Ustilago maydis* se hizo por similitud de secuencia usando el programa BLAST en el servidor y la base de datos de *U maydis* (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/Ustilago>) utilizando como sonda las proteínas de *S. cerevisiae* o *S. pombe*. Para analizar la identidad de secuencia se usó el programa BLAST del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos de las proteínas se realizaron con el programa ClustalW.

## **8. Construcción de las distintas estirpes de *U. maydis***

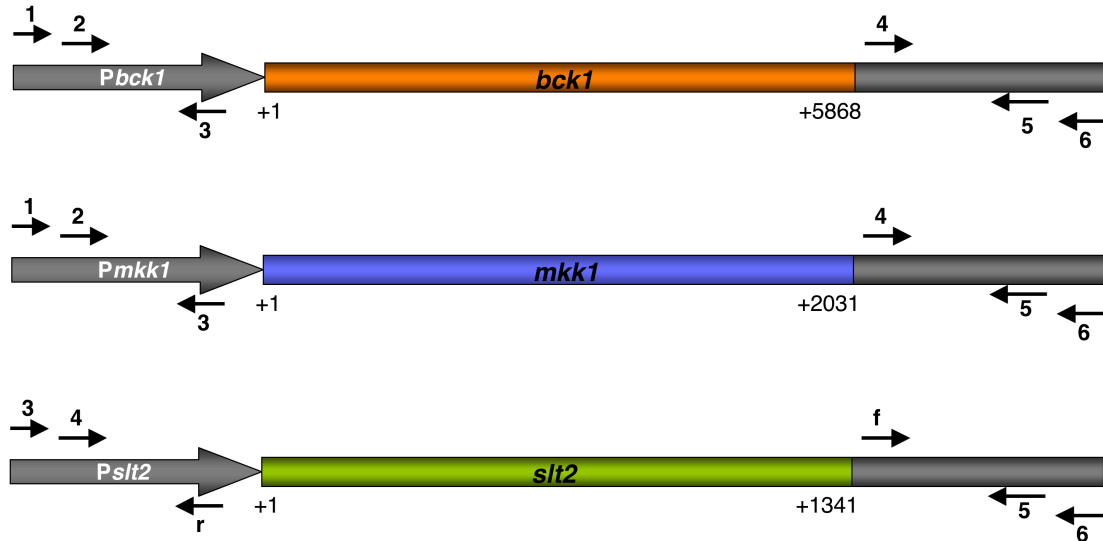
En este apartado se detallan las construcciones y la metodología general utilizada para obtener las distintas estirpes de *U. maydis*. En el Anexo 1 se describen los oligonucleótidos utilizados. Las sustituciones puntuales de aminoácidos se verificaron mediante secuenciación.

### **8.1 Delección de los genes *bck1*, *mkk1* y *slt2***

Para construir las estirpes con pérdida de función se interrumpieron los genes por reemplazamiento homólogo siguiendo los protocolos de Kämper (2004) y Brachmann et al. (2004). Para ello se amplificaron dos fragmentos flanqueantes de los genes *bck1*, *mkk1* y *slt2* y se digirieron con la enzima de restricción *Sfi*I para ligarlos posteriormente al gen que confiere resistencia a: nourseotricina, higromicina y carboxina respectivamente. Las resistencias se obtuvieron por digestión de los plásmidos pUMa262, pUMa261 y pUMa260 con la misma enzima. Los fragmentos correspondientes a las regiones 5' se amplificaron con los siguientes oligonucleótidos: Bck1-2 y Bck1-3; Mkk1-2 y Mkk1-3; Sl2-4 y Sl2-r. Los fragmentos correspondientes a la región 3' se amplificaron con los siguientes oligonucleótidos: Bck1-4 y Bck1-5; Mkk1-4 y Mkk1-5; Sl2-5 y Sl2-f. A continuación se transformaron las diferentes estirpes con los fragmentos resultantes de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: Bck1-1 y Nat1; Mkk1-1 y Smut3; Sl2-3 y Cbx1 para el extremo 5' y Bck1-6 y Nat2, Mkk1-6 y



Smut1, Slt2-6 y Cbx2 para el extremo 3'. Estas PCR rindieron fragmentos de 0,87 Kb, 0,8 Kb y 0,8 Kb respectivamente para los extremos 5' y de 0,71 Kb, 1,8 Kb y 1,1 Kb para los extremos 3' en el caso de una correcta substitución y no rindieron producto en caso contrario (Fig. 7).



**Figura 7.** Esquema de los genes *bck1*, *mkk1* y *slt2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

## 8.2 Construcción y expresión del alelo *HA-slt2* bajo el promotor *Pslt2*

Para estudiar el papel de Slt2 en la ruta de integridad celular se construyó el alelo *HA-slt2*. Para ello se amplificó el promotor *Pslt2* con los oligonucleótidos Slt2-KF y Slt2-11 generando un fragmento de 1,7 Kb. Por otra parte, se amplificó el gen *slt2* (que se extiende desde el nucleótido +1 al nucleótido +1341, considerando la adenina del ATG como el nucleótido +1) con los oligonucleótidos Slt2-10 y Slt2-KR generando un fragmento de 1,3 Kb. Ambos fragmentos se digirieron con las enzimas *KpnI*/*NdeI* y se ligaron al vector pUMa260 previamente digerido con *KpnI*, generando el plásmido pUMa-Slt2. El epítipo HA se obtuvo por la digestión del plásmido pGem-HA que contiene este fragmento flanqueado por los sitios *NdeI*. Este fragmento se clonó en el plásmido pUMa-Slt2 digerido con *NdeI*. La correcta orientación del epítipo HA se verificó mediante PCR utilizando dos parejas de oligonucleótidos, S-HA /

Slt2-2 y AS-HA / Slt2-3. Estas PCR rindieron fragmentos de 1,4 Kb y 0,8 Kb respectivamente en el caso que la orientación fuera la correcta. El plásmido (pUMa-HASlt2) obtenido fue linealizado por digestión con la enzima *AgeI* e integrado en el locus de la succinato dehidrogenasa (*cbx*). Los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos Slt2-3 y Slt2-2 generando un fragmento de 2,1 Kb en el caso de una correcta integración (Fig. 8).

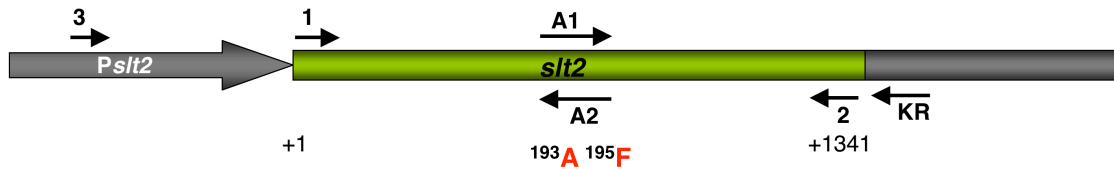


**Figura 8.** Esquema del gen *slt2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

### 8.3 Construcción y expresión del alelo *HA-slt2<sup>AEF</sup>*

Para la construcción del alelo *HA-slt2<sup>AEF</sup>*, que codifica para una versión no fosforilable de Slt2, se introdujeron sustituciones puntuales que permitieron el cambio de los aminoácidos treonina de la posición 193 y tirosina de la posición 195 por residuos de alanina y fenilalanina respectivamente. Estos cambios se incorporaron mediante PCR utilizando un par de oligonucleótidos complementarios con las correspondientes sustituciones que a la vez creaban un sitio *EcoRI* con el cambio a fenilalanina. Se realizó una primer ronda de PCR con los pares de oligonucleótidos Slt2-1 / Slt2-A2 y Slt2-A1/ Slt2-KR. Estas PCR rindieron fragmentos de 0,6 Kb y 0,8 Kb que fueron utilizados como moldes para la segunda amplificación, obteniéndose un fragmento de 1,36 Kb correspondiente al gen *slt2* con las mutaciones <sup>193</sup>A y <sup>195</sup>F. Este fragmento junto con el fragmento *Pslt2* se digirieron con *NdeI/KpnI* y se ligaron al vector pUMa260 previamente digerido con *KpnI*, generando el plásmido pUMa-Slt2<sup>AEF</sup>. EL epítipo HA se insertó como se mencionó anteriormente, obteniéndose el plásmido pUMa-HASlt2<sup>AEF</sup>, el cual fue linealizado por digestión con la enzima *AgeI* y se integro en el locus *cbx*. Los transformantes se chequearon por PCR

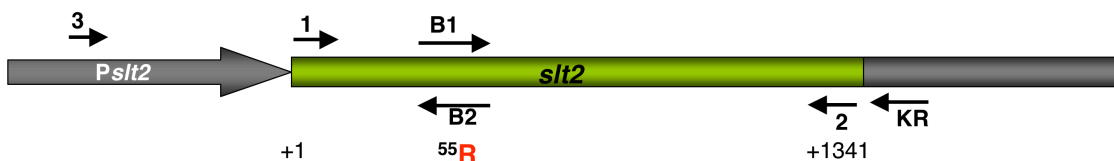
de la misma manera que para la versión silvestre. Además, los productos fueron digeridos con *EcoRI* para comprobar que portaban la mutación <sup>195</sup>F. (Fig. 9).



**Figura 9.** Esquema del gen *slt2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

#### 8.4 Construcción y expresión del alelo *HA-slt2<sup>KD</sup>*

Para la construcción del alelo *HA-slt2<sup>KD</sup>*, que codifica para una versión catalíticamente inactiva de la proteína, se introdujo una sustitución puntual que permitió el cambio de una lisina de la posición 55 por una arginina. Este cambio se realizó siguiendo la misma estrategia descrita anteriormente. En la primer ronda de amplificaciones se utilizaron los oligonucleótidos Slt2-1 / Slt2-B2 y Slt2-B1 / Slt2-KR que rindieron fragmentos de 0,18 Kb y 1,2 Kb respectivamente. Con la segunda amplificación se obtuvo un fragmento de 1,36 Kb correspondiente al gen *slt2* con la mutación <sup>55</sup>R. Tanto la clonación de este fragmento como el chequeo de los transformante se realizó de la misma manera que para la versión *HA-slt2<sup>AEF</sup>* (Fig. 10).

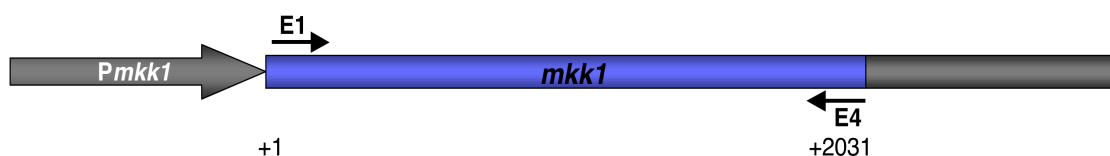


**Figura 10.** Esquema del gen *slt2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

#### 8.5 Expresión de *mkk1* bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*

Para la sobreexpresión de Mkk1 se utilizó el promotor regulable por fuente de carbono *Pcrg1*. La construcción *P<sub>crg1</sub>:mkk1* se obtuvo mediante la amplificación del gen *mkk1* (que se extiende desde el nucleótido +1 al

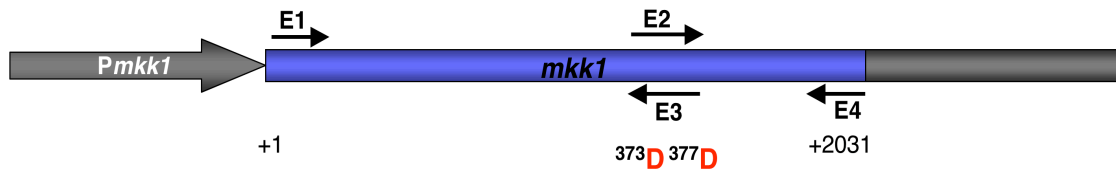
nucleótido +2031, considerando la adenina del ATG como el nucleótido +1), usando para ello los oligonucleótidos Mkk1-E1 y Mkk1-E4. El producto de PCR resultante se clonó como un fragmento *NdeI* / *EcoRI* en el plásmido pRU11, vector de integración que contiene el promotor *Pcrg1* y el gen que confiere resistencia a carboxina. El plásmido resultante pRU11-Mkk1 se digirió con *XcmI* y se utilizó para transformar las distintas estirpes de *U. maydis*. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos *crg1* y Mkk1-E4 (Fig. 11).



**Figura 11.** Esquema del gen *mkk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

## 8.6 Construcción y expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*

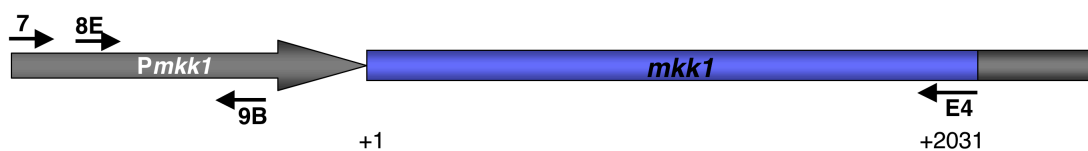
Para la construcción *P<sub>crg1</sub>:mkk1<sup>DD</sup>*, que codifica para una versión constitutivamente activa de *mkk1*, se introdujeron sustituciones puntuales que permitieron el cambio de los aminoácidos serina de la posición 373 y treonina de la posición 377 por residuos aspárticos. Estos cambios se incorporaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Mkk1-E1/Mkk1-E3 y Mkk1-E2/Mkk1-E4 que a la vez creaban un sitio de restricción *NaeI*. Las PCR rindieron fragmentos de 1,3 Kb y 0,9 Kb respectivamente. Con la segunda amplificación se obtuvo un fragmento de 2,1 Kb correspondiente al gen *mkk1* con las mutación <sup>373</sup>D y <sup>377</sup>D. Este fragmento se digirió con *NdeI*/*EcoRI* y se clonó en el vector pRU11. El plásmido resultante pRU11-Mkk1<sup>DD</sup> se digirió con *XcmI* y se utilizó para transformar las distintas estirpes de *U. maydis* (Fig. 12).



**Figura 12.** Esquema del gen *mkk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

### 8.7 Expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el promotor *Pcrg1* desde el locus endógeno

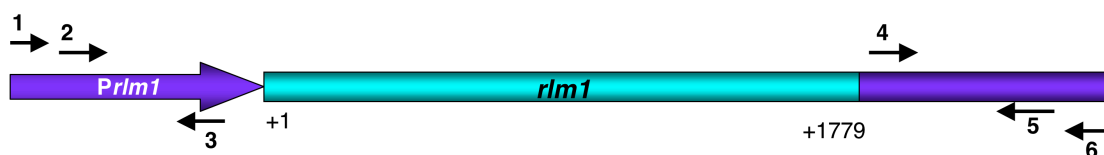
La construcción *mkk1<sup>DDcrg1</sup>* permitió sustituir el alelo silvestre *mkk1* por el alelo mutante *mkk1<sup>DD</sup>* regulado por el promotor *Pcrg1*. Para intercambiar los alelos se amplificó un fragmento flanqueante a *mkk1* por la región 5' con los oligonucleótidos Mkk1-8E y Mkk1-9B (0,86 Kb). Este fragmento se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BamH1*. El alelo *mkk1<sup>DD</sup>* se obtuvo de la digestión del plásmido pRU11-Mkk1<sup>DD</sup> con *NdeI/BamH1*. Estos dos fragmentos se clonaron mediante una ligación triple al vector pRU11-Hyg (contiene promotor *Pcrg1* y el gen que confiere resistencia a higromicina) digerido previamente con *NdeI/BamH1*. El plásmido resultante se denominó pRU11Hyg-Mkk1<sup>DDcrg1</sup> y se digirió con la enzima *EcoRI* para su integración. Los transformantes se chequearon por PCR por el extremo 5' con los oligonucleótidos Mkk1-7 y Smut3, por el otro extremo con *crg1* y Mkk1-E4 en el caso de una correcta integración rindieron fragmentos de 1,3 Kb y 2,2 Kb (Fig. 13).



**Figura 13.** Esquema del gen *mkk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

## 8.8 Delección del gen *rlm1*

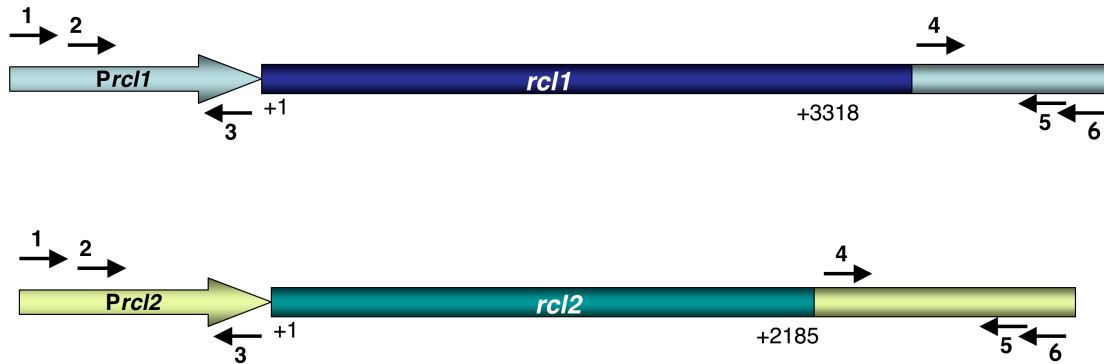
Para construir la estirpe  $\Delta rlm1$  se siguió la misma estrategia descrita anteriormente utilizando nourseotricina como marcador de selección. La resistencia se obtuvo por digestión del plásmido pUMa262 con la enzima *Sfi*I. El fragmento correspondiente a la región 5' se amplificó con los oligonucleótidos Rlm1-2 y Rlm1-3. El fragmento correspondiente a la región 3' se amplificó con los oligonucleótidos Rlm1-4 y Rlm1-5. Ambos fragmentos se digirieron con *Sfi*I y se ligaron al marcador de selección. Se transformó *U. maydis* con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos Rlm1-1 y Nat1 (fragmento de 0,85 Kb) y Rlm1-3, Nat2 (fragmento de 0,8 Kb) (Fig. 14).



**Figura 14.** Esquema del gen *rlm1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

## 8.9 Delección de los genes *rcl1* y *rcl2*

Para construir las estirpes  $\Delta rcl1$  y  $\Delta rcl2$  se amplificaron los fragmentos río arriba al extremo 5' de los genes *rcl1* y *rcl2* con los oligonucleótidos Rcl1-2/Rcl1-3 y Rcl2-2/Rcl2-3. Los fragmentos correspondientes a la región 3' se amplificaron con los oligonucleótidos Rcl1-4/Rcl1-5 y Rcl2-4/Rcl2-5. Los genes que confieren resistencia a higromicina y carboxina se obtuvieron por la digestión de los plásmidos pUMa261 y pUMa260 con la enzima *Sfi*I. A continuación se transformaron las diferentes estirpes con los fragmentos resultantes de la ligación tripartita. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos: Rcl1-1/Smu3 y Rcl2-1/Cbx1 para el extremo 5' y Rcl1-6/Smu1 y Rcl2-6/Cbx2 para el extremo 3'. Estas PCR rindieron fragmentos de 0,7 Kb para los extremos 5' y de 1,6 Kb y 1,3 Kb respectivamente para los extremos 3' (Fig. 15).



**Figura 15.** Esquema de los genes *rcl1* y *rcl2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

### 8.10 Delección del gen *spa2*

Para construir la estirpe con pérdida de función se siguió la misma estrategia descrita anteriormente. Para ello se amplificaron dos fragmentos flanqueantes del gen *spa2* y se digirieron con la enzima *Sfi*I para ligarlos posteriormente al gen que confiere resistencia a nourseotricina obtenido por digestión del plásmido pUMa262 con la misma enzima. El fragmento correspondiente a la región 5' se amplificó con los oligonucleótidos Spa2-2 y Spa2-3. El fragmento correspondiente a la región 3' se amplificó con los oligonucleótidos Spa2-4 y Spa2-5. A continuación se transformó *U. maydis* con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos Spa2-1 / Nat1 y Spa2-6 / Nat2. Estas PCR rindieron fragmentos de 1,1 Kb y 0,96 Kb respectivamente (Fig. 16).

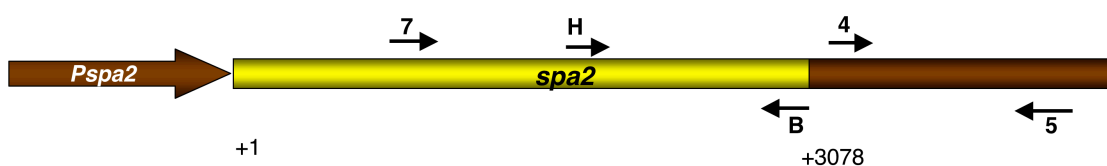


**Figura 16.** Esquema del gen *spa2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

### 8.11 Expresión del alelo *spa2-GFP*

Para obtener una versión de Spa2 que permitiera estudiar la localización de la proteína, se fusionó la proteína GFP (*green fluorescent protein*) al extremo

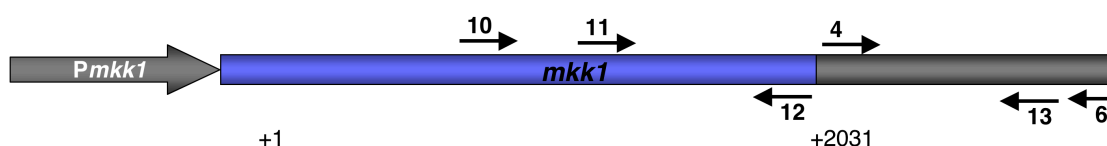
carboxilo terminal de Spa2. Para ello, se amplificó, por un lado, un fragmento correspondiente al final del gen con la pareja de oligonucleótidos Spa2-H y Spa2-B y otro fragmento flanqueante de *spa2* por la región 3' con la pareja Spa2-4 y Spa2-5. Ambos fragmentos se digirieron con *Sfi*I para ligarlos a un casete que llevaba la proteína GFP y el gen de resistencia a higromicina obtenido por digestión del plásmido pMF5-3n con la misma enzima. Con el producto de ligación se transformaron las diferentes estirpes. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos Spa2-7 y gfp1 que amplificaron un fragmento de 1,7 Kb (Fig. 17).



**Figura 17.** Esquema del gen *spa2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

## 8.12 Expresión del alelo *mkk1-GFP*

Para estudiar la localización de Mkk1 se fusionó la proteína GFP (*green fluorescent protein*) al extremo carboxilo terminal, siguiendo la estrategia descrita anteriormente. Para ello, se amplificó un fragmento correspondiente al final del gen, con la pareja de oligonucleótidos Mkk1-11 y Mkk1-12. El fragmento correspondiente a la región 3' se amplificó con la pareja Mkk1-4 y Mkk1-5. Ambos fragmentos se digirieron con *Sfi*I para ligarlos al casete GFP-Higromicina obtenido por digestión del plásmido pMF5-3n con la misma enzima. Con el producto de ligación se transformaron las diferentes estirpes. Los transformantes se chequearon por PCR por un extremo utilizando los oligonucleótidos Mkk1 y gfp1 que amplificaron un fragmento de 1,7 Kb. Y por el otro extremo con Smut4 y Mkk1-6 rindiendo un fragmento de 1 Kb (Fig. 18).



**Figura 18.** Esquema del gen *mkk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos



### 8.13 Expresión del alelo *GFP-slt2*

Para obtener una versión de Slt2 que permitiera estudiar la localización de la proteína, se fusionó la proteína GFP (*green fluorescent protein*) al extremo amino terminal de Slt2. Para ello, se digirieron los plásmidos pUMa-Slt2 y pGem-GFP con la enzima *Nde*I. La digestión del vector pGem-GFP libera un casete de GFP flanqueado por dos sitios *Nde*I, el cual se ligo al plásmido pUMa-Slt2. La correcta orientación del casete GFP se verificó mediante PCR utilizando dos parejas de oligonucleótidos, Slt2-4/GFP-AS y GFP-S/Slt2-2. Estas PCR rindieron fragmentos de 1,3 Kb y 2,0 Kb en el caso que la orientación fuera la correcta. El plásmido obtenido, pUMa-GFPSlt2 fue linealizado por digestión con la enzima *Age*I e integrado en el locus *cbx*. Los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos Slt2-4 y GFP-AS generando un fragmento de 1,3 Kb en el caso de una correcta integración (Fig. 19).



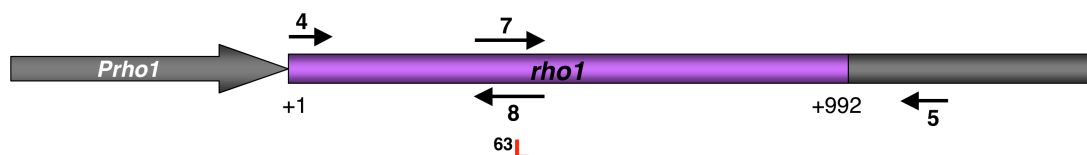
**Figura 19.** Esquema de la construcción *gfp-slt2* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

### 8.14 Construcción y expresión de los alelos *T7-rhos<sup>QL</sup>* bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*

Para la construcción del alelo *rho1<sup>QL</sup>*, que codifica para una versión constitutivamente activa de la GTPasa, se introdujo una sustitución puntual que permitió el cambio de un residuo de glutamina de la posición 63 por un residuo de leucina. Estos cambios se incorporaron mediante PCR utilizando un par de oligonucleótidos complementarios con la sustitución. En la primera ronda de PCR se utilizaron los oligonucleótidos Rho1-4/Rho1-8 y Rho1-5/Rho1-7. Las PCR rindieron fragmentos de 0,58 Kb y 0,63 Kb respectivamente. Con la segunda amplificación se obtuvo un fragmento de 1,2 Kb correspondiente al gen *rho1* con la mutación <sup>63</sup>L. Este fragmento se digirió con *Bam*HI/*Eco*RI y se clonó en

el vector pRU11-T7 que contiene el promotor *Pcrg1* fusionado al epítipo T7, de forma tal que el epítipo se introduce en el extremo amino terminal. EL plásmido resultante pRU11-T7Rho1<sup>QL</sup> se linealizó con *SspI* para integrarlo en el locus *cbx*. Los transformantes se chequearon por PCR obteniéndose un fragmento de 1,3Kb con los oligonucleótidos *crg1* y *cbx2*.

También se generó un plásmido que llevaba una versión sin mutación de *rho1*. Para ello se amplificó el gen con los oligonucleótidos Rho1-4 y Rho1-5. Este fragmento se digirió con *BamHI/EcoRI* y se integró en el vector pRU11-T7 previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante es el pRU11-T7Rho1 que se integro en el locus *cbx* de la misma manera (Fig. 20).



**Figura 20.** Esquema del gen *rho1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

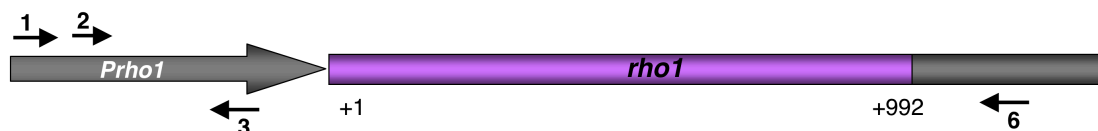
Para la construcción de los alelos *rho2*<sup>QL</sup>, *rho3*<sup>QL</sup> y *rho4*<sup>QL</sup> se prosiguió exactamente de la misma manera. Los oligonucleótidos utilizados en la primer ronda de PCR fueron los siguientes: Rho2-4/Rho2-8 y Rho2-7/Rho2-5; Rho3-4/Rho3-8 y Rho3-7/Rho3-5; Rho4-4/Rho4-8 y Rho4-7/Rho4-5. Las PCR rindieron fragmentos de: 0,16 y 0,75 Kb; 0,31 y 0,5 Kb; 0,27 y 0,63 Kb respectivamente. Con la segunda amplificación se obtuvieron fragmentos de 0,92 Kb, 0,81 Kb y 0,9 Kb correspondientes a los genes *rho2*, *rho3* y *rho4* con las mutación <sup>65</sup>L, <sup>77</sup>L y <sup>90</sup>L. En estos casos los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos siguientes: *crg1* y Rho2-5 (fragmento de 0,92 Kb), *crg1* y *rho3*-5 (fragmento de 0,9) y *crg1* y Rho4-5 (fragmento de 0,9 Kb).

### 8.15 Sustitución del promotor silvestre *Prho* por el promotor regulable *Pnar1*

La construcción *rho1*<sup>nar1</sup> permitió sustituir el promotor *rho1* por el promotor regulable por fuente de nitrógeno *Pnar1*. Para intercambiar los promotores se amplificó un fragmento flanqueante al gen por la región 5' con

los oligonucleótidos Rho1-2 y Rho1-3, que se clonó en pGemT para luego sacarlo como fragmento *EcoRI*. De la digestión del plásmido pRU11-T7Rho1 con *EcoRI* y *BamHI* se obtuvo el otro fragmento de homología. Este fragmento se ligo al vector pRU2-T7 que contiene el promotor *Pnar1* fusionado al epítipo T7 y el gen que confiere resistencia a higromicina, previamente digerido con *EcoRI*/ *BamHI*. El plásmido resultante se digirió con *EcoRI* y se ligo con el fragmento proveniente de pGemT. De esta ligación resultaron dos plásmidos, se digirió con *SpeI* el que presentaba la orientación correcta y se utilizó este fragmento para transformar la estirpe silvestre FB1. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos Rho1-1 y Smut3 (fragmento de 0,9 Kb) y Rho1-6 y nar1 (fragmento de 2,1 Kb).

Para la construcción de *rho2<sup>nar</sup>* y *rho4<sup>nar</sup>* se prosiguió exactamente de la misma forma. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento flanqueante al gen por la región 5' fueron: Rho2-2/Rho2-3 y Rho4-2/Rho4-3. Y los transformantes se chequearon con los Rho2-1 y Smut3 (fragmento de 1,0 Kb), Rho4-1 y smut3 (fragmento de 0,9) , Rho2-6 y nar1 (fragmento de 2,1 Kb) y Rho4-6 y nar1 (fragmento de 2,2 Kb) (Fig. 21).



**Figura 21.** Esquema del gen *rho1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos



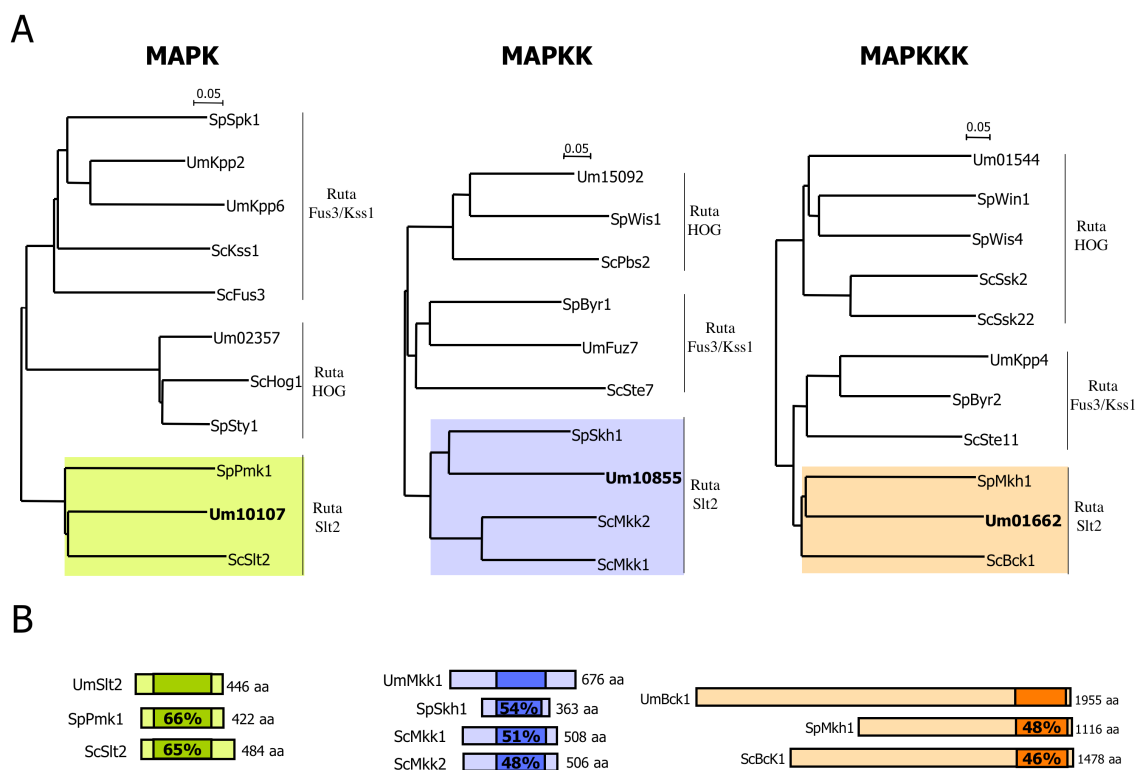




## **1. Modulo Central MAP quinasa**

### **1.1 Identificación de las MAPKs de integridad celular en *U. maydis***

Comenzamos el estudio de la cascada MAP quinasa de integridad celular en *U. maydis* con una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con las proteínas MAPK, MAPKK y MAPKKK de *S. cerevisiae* y de *S. pombe* en la secuencia pública de *U. maydis* ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago\\_maydis / Home.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/ustilago_maydis/Home.html)). Tras los alineamientos múltiples de las secuencias construimos tres dendrogramas con todas las secuencias MAPK, MAPKK y MAPKKK descritas en *S. cerevisiae* y *S. pombe* junto a las posibles secuencias de *U. maydis*. En cada dendrograma se distinguieron tres grupos: El grupo 1 incluía las quinasas involucradas en apareamiento y crecimiento filamentoso al que denominamos conjuntamente como ruta Fus3/Kss1, el grupo 2 agrupaba a las proteínas quinasas de señalización en respuesta a estrés osmótico o ruta HOG y el grupo 3, el que suscita nuestro interés, estaba formado por las proteínas que definen la ruta de integridad celular o ruta Slt2. Dentro de este grupo encontramos los marcos abiertos de lectura Um10107 en el dendrograma de las MAPK, Um10855 en el de las MAPKK y Um01662 en el de las MAPKKK. La traducción conceptual de estos marcos de lectura abiertos produjeron proteínas de 446, 676 y 1955 aminoácidos, con un peso molecular de 50, 72 y 209 KDa respectivamente. A partir de aquí, denominaremos a estas proteínas UmSlt2, UmMkk1 y UmBck1 o directamente Slt2, Mkk1, Bck1 por analogía a las proteínas de *S. cerevisiae*. Como las otras proteínas quinasas activadas por mitógeno, UmSlt2, UmMkk1 y UmBck1 poseen un dominio serina-treonina proteína quinasa en el extremo carboxilo terminal. El dominio quinasa de UmSlt2 presenta un 66% de identidad de secuencia con la MAP quinasa Pmk1 de *S. pombe* y un 65% con ScSlt2. La identidad de secuencia en los dominios quinasa de UmMkk1 y UmBck1 con respecto a sus homólogos en *S. pombe* y en *S. cerevisiae* es del 45-55% (Fig 23 y Fig. 61, 62, 63 ANEXO 2).



**Figura 23. Identificación de las MAP quinasas.** **A.** Dendrogramas de las MAPK, MAPKK y MAPKKK construido utilizando el método ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>). **B.** Esquema de las MAP quinasas involucradas en la ruta de integridad celular en *U. maydis*, *S. pombe* y *S. cerevisiae* indicando el dominio quinasa y los porcentajes de identidad aminoácídica de las proteínas cuando se compara con el dominio quinasa de *U. maydis*.

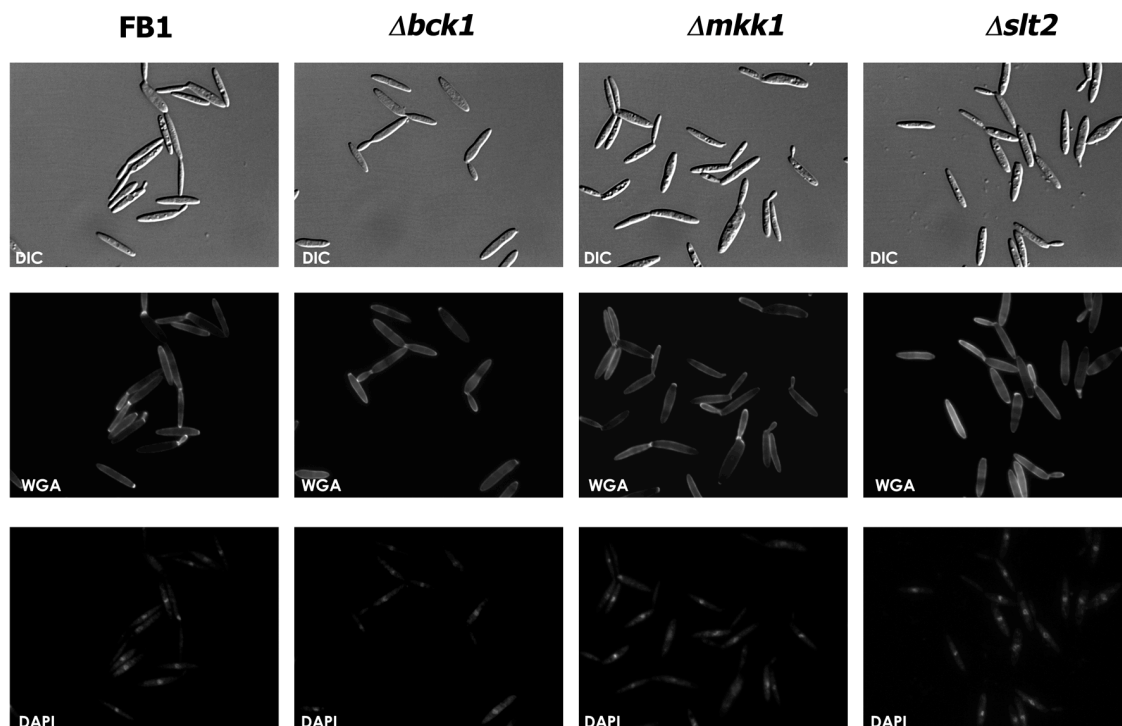
## 1.2 Bck1, Mkk1 y Slt2 constituyen una sola vía de señalización

### MAP quinasa: La ruta de integridad celular

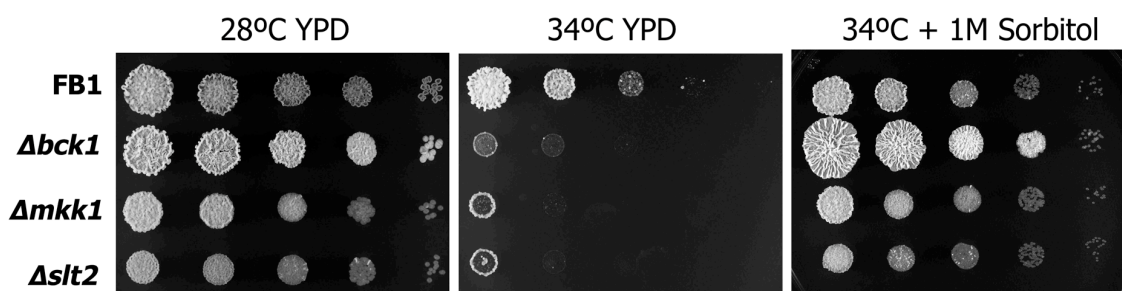
Con la intención de demostrar que estas proteínas estaban implicadas en la vía de señalización conocida como "ruta de integridad celular", se construyeron tres estirpes mutantes individuales donde se sustituyeron las secuencias codificantes *bck1*, *mkk1* y *slt2* por el gen que confiere resistencia a nourseotricina, higromicina y carboxina respectivamente. Estas estirpes resultaron viables, crecieron con normalidad a 28°C que es la temperatura habitual de crecimiento de *U. maydis* y en medio líquido CMD no mostraron diferencias morfológicas con respecto a una estirpe silvestre (Fig.24). Sin embargo, al igual que sucede en *S. cerevisiae*, un aumento de la temperatura



comprometía seriamente la supervivencia de estas células, aunque podría remediarse agregando sorbitol al medio (Fig. 25).



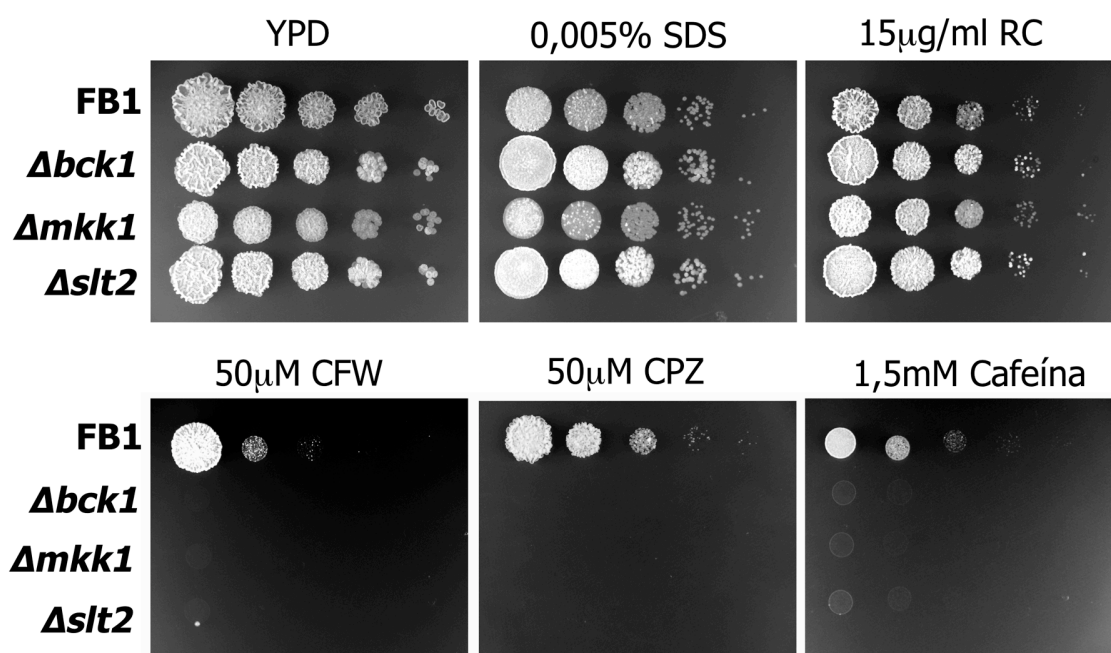
**Figura 24. La pérdida de función de Bck1, Mkk1 y Slt2 no afecta la morfología.** Fenotipo en medio líquido CMD de una estirpe silvestre y las estirpes deficientes en *bck1*, *mkk1* y *slt2*. La tinción de septos es con WGA y la tinción nuclear con Dapi.



**Figura 25. La termosensibilidad de los mutantes nulos se remedia añadiendo sorbitol.** Ensayo de gotas. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD a 28° y 34°C con y sin la adición de sorbitol 1M.

La pérdida de función en estas proteínas también hace mas vulnerables las células al daño provocado por agentes que alteran la estructura de la pared celular (Levin, 2005). Existen diversos agentes que producen estrés sobre la pared. En este trabajo utilizamos para un ensayo de sensibilidad en placa algunos de los agentes mas utilizados como: blanco de calcoflúor (CFW) un

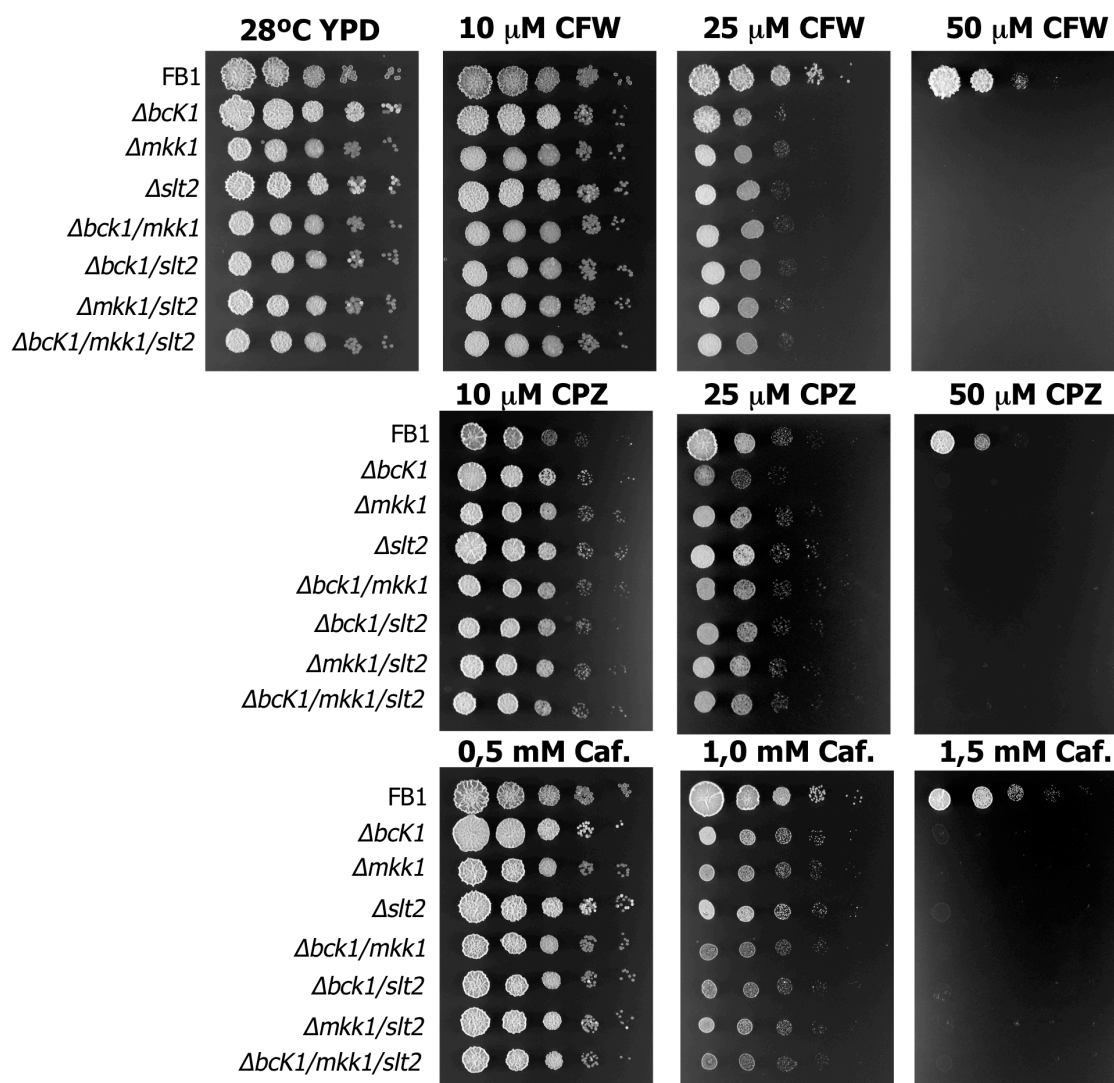
antagonista de la quitina; rojo congo (RC) que interfiere en la unión del  $\beta$ -1,3 glucano; cafeína que hasta el momento no se conoce exactamente el mecanismo por el cual produce estrés sobre la pared celular, pero se cree que actúa sobre el complejo TOR (Kuranda et al., 2006); SDS un detergente tóxico para las células y clorpromazina (CPZ) una molécula anfipática que es un potente activador de la ruta de integridad celular aparentemente porque induce la depolimerización del citoesqueleto de actina (Delley y Hall, 1999). Curiosamente, como se observa en la Figura 26 las estirpes carentes de las proteínas Bck1, Mkk1 y Slit2 en *U. maydis* mostraron mayor sensibilidad a CFW, CPZ y cafeína y en cambio fueron igual de resistentes a SDS y RC que la estirpe silvestre.



**Figura 26.  $\Delta bck1$ ,  $\Delta mkk1$  y  $\Delta slit2$  son sensibles a algunos agentes que causan estrés de pared.** Ensayo de sensibilidad en placa. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD con la adición de SDS (sodio dodecil sulfato), RC (rojo congo), CFW (calcoflúor), CPZ (clorpromazina) y cafeína.

Como cabría esperar de elementos de una misma cascada, la pérdida de función de estas proteínas produjo exactamente los mismos fenotipos. Para reforzar esta idea, nos planteamos la construcción de los dobles y triple mutante para ver si existía algún efecto aditivo o sinérgico en el fenotipo de

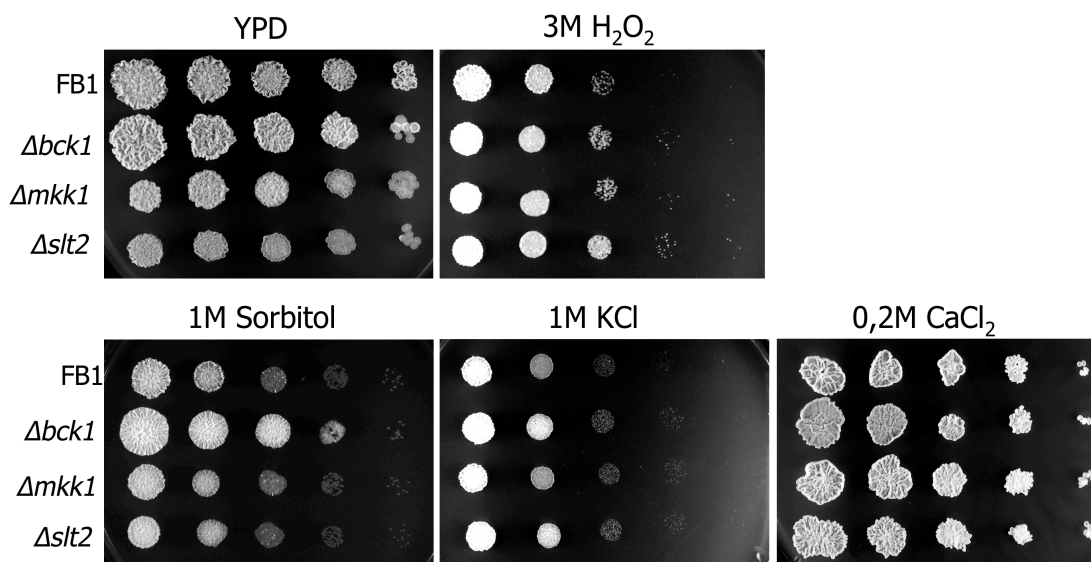
sensibilidad a estos agentes. Como se muestra en la Figura 27 todas las estirpes presentaron el mismo espectro de sensibilidad a distintas concentraciones de CFW, CPZ y cafeína.



**Figura 27. Los dobles y triple mutante tienen el mismo espectro de sensibilidad que los mutantes simples.** Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD con la adición de CFW, CPZ y cafeína a concentraciones crecientes.

La ruta de integridad celular en otros hongos esta relacionada a distintos niveles con la respuesta celular frente a diversos estreses ambientales (térmico, osmótico, oxidativo y en general agentes que perturban la pared celular). Para estudiar la respuesta de los mutantes nulos frente al estrés osmótico realizamos

ensayos de sensibilidad en placas con sorbitol 1M, KCl 1M y  $\text{CaCl}_2$  0,2M. También se ensayó la respuesta de estos mutantes al estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno. Como muestra la Figura 28 la falta de estas proteínas no compromete la viabilidad de las células en presencia de estos agentes.



**Figura 28.  $\Delta bck1$ ,  $\Delta mkk1$  y  $\Delta slt2$  son resistentes al estrés osmótico y oxidativo.**

Ensayo de sensibilidad en placa. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD con la adición de 3M de peróxido de hidrógeno, 1M de sorbitol, 1M de KCl y 0,2M de  $\text{CaCl}_2$ .

En conjunto, los resultados obtenidos indicaron que Bck1, Mkk1 y Slt2 forman parte de una única vía de señalización ortóloga a la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae* y *S. pombe*. Además, que la pérdida de función en alguna de estas proteínas genera células hipersensibles a CFW, CPZ y cafeína.

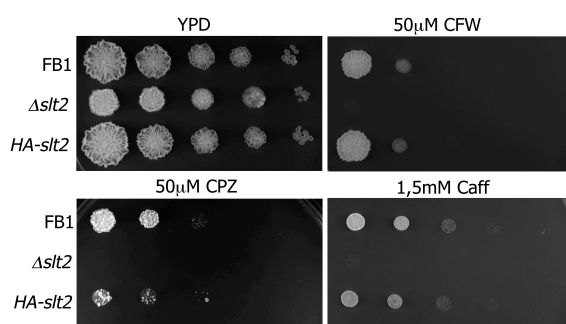
### 1.3 El estrés producido por agentes que dañan la pared activan la MAP quinasa Slt2

Dado que los mutantes nulos fueron mas sensibles a CFW, CPZ y cafeína nos preguntamos si una estirpe silvestre crecida en presencia de estas drogas mostraban una activación de la vía de señalización con la consecuente fosforilación de Slt2. Para ello, creamos una versión silvestre de la proteína Slt2

fusionada a la secuencia que codifica el epítipo HA. Este alelo se expresó bajo su propio promotor en la estirpe UMA44 (FB1 $\Delta$ slt2 PHA-slt2). Esta estirpe es viable y es igual de resistente a CFW, CPZ y cafeína que una estirpe silvestre (Fig. 29). Mediante el uso del anticuerpo comercial que reconoce la doble fosforilación en los residuos Thr<sup>202</sup>/ Tyr<sup>204</sup> de la MAPK p44/42 y que se ha demostrado que reconoce también los residuos Thr/ Tyr fosforilados de la MAPK Slt2 (de Nobel et al., 2000; Martin et al., 2000), demostramos que estos agentes inducen la fosforilación de Slt2 en *U. maydis*. Como muestra la Figura 30A el nivel de fosforilación aumenta luego de 30 minutos en cada tratamiento y esta activación fue sostenida en el tiempo, excepto para el tratamiento con cafeína que tiende a bajar luego de 4 horas.

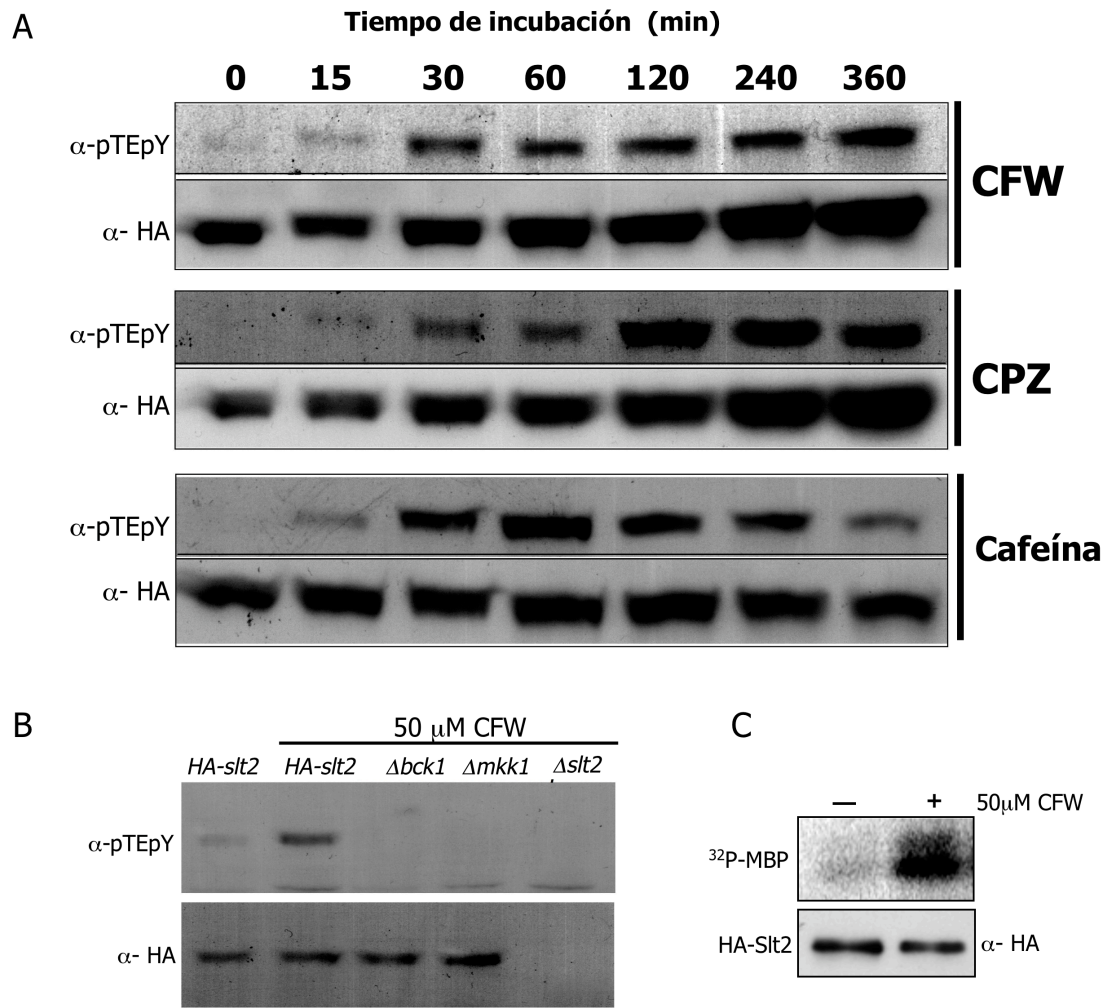
Por otra parte, la pérdida de función en Bck1 ó Mkk1 anula completamente la fosforilación de Slt2 inducida por el CFW (Fig. 30B). Estas observaciones son consistentes con un modelo donde Bck1 y Mkk1 están por encima de Slt2.

Para corroborar que el aumento de la fosforilación de Slt2 se correspondía con un incremento de su actividad quinasa, como se ha propuesto en *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Zarzov et al., 1996; Kamada et al., 1995 y Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), utilizamos como sustrato para un ensayo *in vitro* la proteína básica de mielina bovina, MBP (18kDa) (Errede et al., 1993). En este caso, se creció la estirpe UMA44 en presencia y ausencia de CFW en el medio. Al cabo de una hora se obtuvieron extractos proteicos que se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo anti-HA. La fracción inmunoprecipitada de ambos cultivos se usó para el ensayo de actividad quinasa. Como se muestra en la Figura 30C hubo un incremento en la fosforilación de MBP en presencia de CFW.



**Figura 29. El epítipo HA no afecta la función de la proteína.** Ensayo de sensibilidad en placa. La estirpe silvestre (FB1) y la UMA44(HA-slt2) se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD con la adición de CFW, CPZ y cafeína.





**Figura 30. Agentes que dañan la pared activan Slt2.** **A.** La estirpe UMA44(FB1Δ*slt2* *pHA-slt2*) fue crecida en presencia de 50μM calcoflúor (CFW), 50μM clorpromazina (CPZ) y 1,5mM cafeína durante 6 horas. Las muestras fueron recolectadas en los tiempos indicados en la figura y procesados para *Western blot*. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo α-p44/42MAPK y la cantidad total de HA-Slt2 con el anticuerpo α-HA. **B.** Las estirpes UMA44, UMA44.2 (*pHA-slt2* Δ*bck1*), UMA44.3 (*pHA-slt2* Δ*mkk1*) y UMA3 (Δ*slt2*) fueron crecidas con CFW por 30 min. y procesadas para *Western blot*. **C.** Ensayo de actividad quinasa sobre MBP de los inmunoprecipitados de la estirpe UMA44 sin tratar y tratada con CFW por 30 min.

Del análisis de estos resultados podemos concluir que Slt2 se fosforila en respuesta al estrés producido por agentes que dañan la pared, que esta fosforilación es dependiente de Bck1 y Mkk1 y que la actividad quinasa se correlaciona con esta fosforilación.

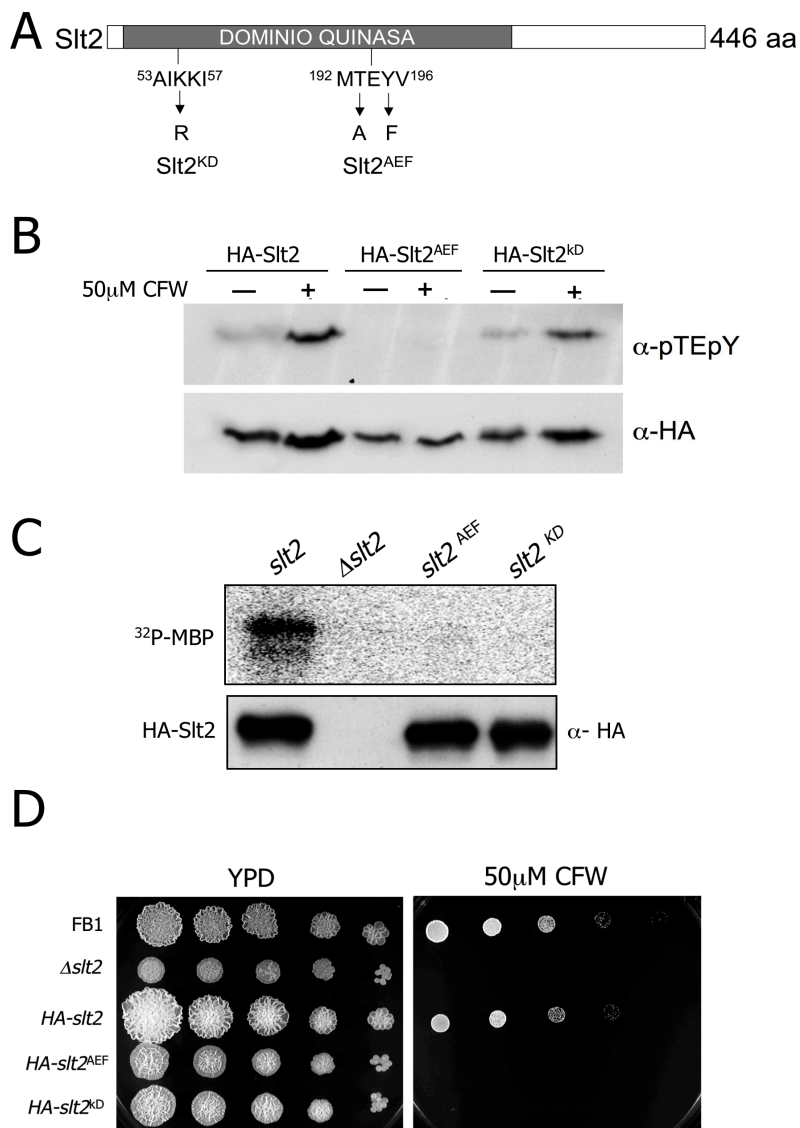
#### 1.4 La fosforilación y la actividad quinasa de Slt2 son necesarias para la viabilidad de las células frente a un estrés de pared

Una vez demostrado que Slt2 se fosforilaba en presencia de CFW y que esta fosforilación se correlacionaba con un aumento de su actividad quinasa, nos preguntamos si la actividad quinasa de Slt2 era necesaria para generar resistencia frente a un estrés de pared celular *in vivo*. Para ello, se construyó el alelo *HA-slt2<sup>KD</sup>*, en donde se sustituyó una lisina por una arginina de la posición 55 dentro del dominio de unión al ATP (Fig. 31 A). Esta mutación en otras quinasas produce una proteína catalíticamente inactiva (Posada y Cooper, 1992). El alelo *HA-slt2<sup>KD</sup>* se expresó bajo su promotor nativo en la estirpe UMA60 (*FB1Δslt2 PHA-slt2<sup>KD</sup>*). La falta de actividad quinasa de este alelo no afectó a la capacidad de la proteína para ser fosforilada por Mkk1. Como se observa en la Figura 31 B y C la fosforilación del alelo *HA-slt2<sup>KD</sup>* aumentó en presencia de CFW pero no así la capacidad para fosforilar MBP en un ensayo de actividad quinasa. Sin embargo, solamente la fosforilación de Slt2<sup>KD</sup> no genera resistencia al CFW. La estirpe UMA60 no es capaz de crecer en presencia de esta droga en el medio (Fig. 31 D).

Como el resto de las MAPKs Slt2 poseía un motivo aceptor de fosfato TEY, compuesto por una treonina y una tirosina separados por un aminoácido que puede variar en función del tipo de MAPK, localizado dentro del dominio quinasa (Kultz, 1998). Para corroborar que la fosforilación de Slt2 era esencial para su función *in vivo*, construimos un alelo *HA-slt2<sup>AEF</sup>* que no puede ser fosforilado. Este alelo se construyó intercambiando la treonina (193) y la tirosina (195) por una alanina y una fenilalanina respectivamente. Ambos aminoácidos no pueden ser fosforilados (Fig. 31 A). El alelo mutante *HA-slt2<sup>AEF</sup>* se expresó bajo su propio promotor en la estirpe UMA59 (*FB1Δslt2 PHA-slt2<sup>AEF</sup>*). Como esperábamos, no se detectó fosforilación de Slt2 en esta estirpe luego de la activación de la ruta con CFW (Fig. 31 B). Esta ausencia de fosforilación se correlacionó con una falta de actividad quinasa de la proteína. Como se observa en la Figura 31 C, en un ensayo de actividad quinasa el alelo *HA-slt2<sup>AEF</sup>* no fue capaz de fosforilar al sustrato MBP. Además, la fosforilación del motivo TEY es

esencial para las funciones de la proteína, como muestra la Figura 31 D la estirpe UMA59 fue igual de sensible al CFW que la estirpe deficiente en *slt2*.

Los resultados obtenidos nos indicaron: en primer lugar que la actividad quinasa de Slt2 era necesaria para inducir tolerancia al CFW en el medio; y en segundo lugar que esta función es dependiente de la fosforilación de Slt2 en los residuos treonina y tirosina.



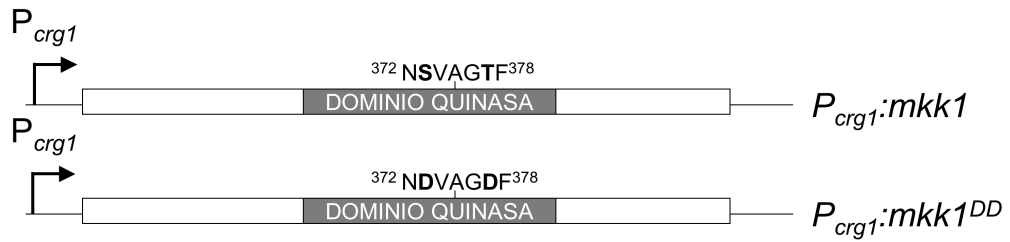
**Figura 31. La fosforilación y la actividad quinasa de Slt2 son necesarios para la viabilidad celular frente a estrés.** **A.** Esquema de la proteína Slt2 donde se indica las sustituciones realizadas para la construcción de las estirpes que portan los alelos *HA-slt2*<sup>KD</sup> (UMA60) y *HA-slt2*<sup>AEF</sup> (UMA59). **B.** Las estirpes UMA44, UMA59 y UMA60 se crecieron en presencia (30 min) y ausencia de CFW y se procesaron para *Western blot*. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo α-p44/42MAPK y la cantidad total de HA-Slt2 con el anticuerpo α-HA. **C.** Ensayo de actividad quinasa sobre MBP de los inmunoprecipitados de las estirpes UMA44, UMA3, UMA59 y UMA60 tratadas con CFW por 30 min. **D.** Ensayo de sensibilidad en placa. La estirpe silvestre FB1 junto con las estirpes UMA3, UMA44, UMA59 y UMA60 se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD con la adición de CFW.



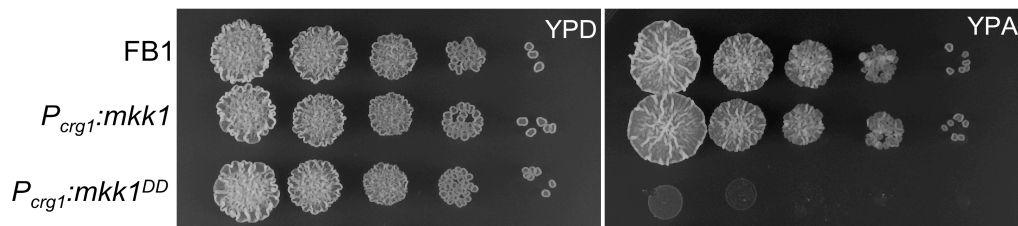
### 1.5 La hiperactivación de la ruta de integridad celular tiene un efecto tóxico en *U. maydis*

Continuando con la caracterización del modulo MAP quinasa en *U. maydis* se construyó una estirpe que poseía una versión constitutivamente activa de la proteína Mkk1. Las proteínas MAP quinasa-quinasa son activadas por una doble fosforilación en dos residuos serina o serina/treonina que se encuentran próximos dentro del dominio quinasa (Cobb y Goldsmith, 1995). Estudios previos en otras MAPKKs han indicado que cambios en estos residuos por aminoácidos cargados negativamente producen una proteína constitutivamente activa (Muller et al., 2003; Shiozaki et al., 1998) Mkk1 posee estos sitios de fosforilación conservados en las posiciones 373 (serina) y 377 (treonina). Por lo cual construimos un alelo constitutivamente activo *mkk1<sup>DD</sup>* sustituyendo los aminoácidos conservado en estas posiciones por dos aspárticos. Estos dos cambios supuestamente mimetizan el estado fosforilado consecuente de la actividad MAP quinasa-quinasa-quinasa de Bck1. El alelo mutante *mkk1<sup>DD</sup>* y el alelo silvestre *mkk1* se pusieron bajo el control de un promotor regulable por fuente de carbono *Pcrg1*, que permite su inducción en medios con arabinosa y su represión en medios con glucosa (Fig. 32 A). Ambas construcciones se insertaron en el locus *cbx* generando las estirpes UMA7 (FB1 *Pcrg1:mkk1<sup>DD</sup>*) y UMA12 (FB1 *Pcrg1:mkk1*). Se analizó la capacidad de crecer de ambas estirpes en condiciones de inducción y no inducción. Como se muestra en la Figura 32 B la expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* afecta el crecimiento impidiendo la formación de colonias en medio sólido inductor (YPA). Además, cuando se analizó la estirpe UMA7 en medio líquido con arabinosa (YPA), observamos que la población presentaba una morfología aberrante. Las células se dividían por septos en compartimientos que poseían un solo núcleo, pero no eran capaces de separarse. Sin embargo, la sobreexpresión del alelo *mkk1* silvestre produjo células viables sin cambios en la morfología en estas mismas condiciones (permisivas) (Fig. 32 C y 33 A).

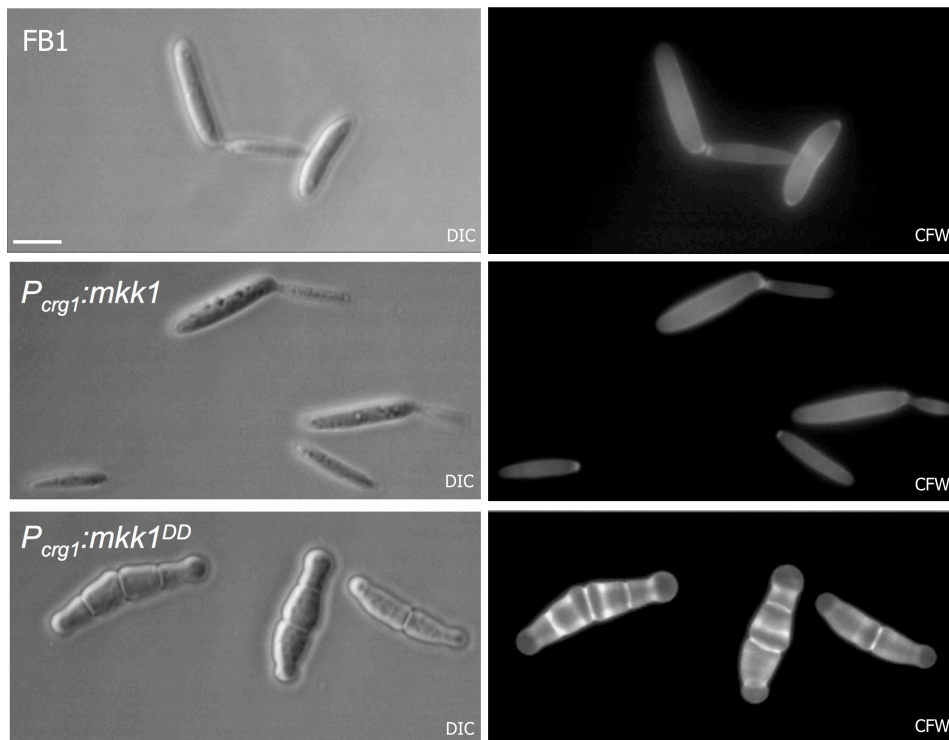
A



B



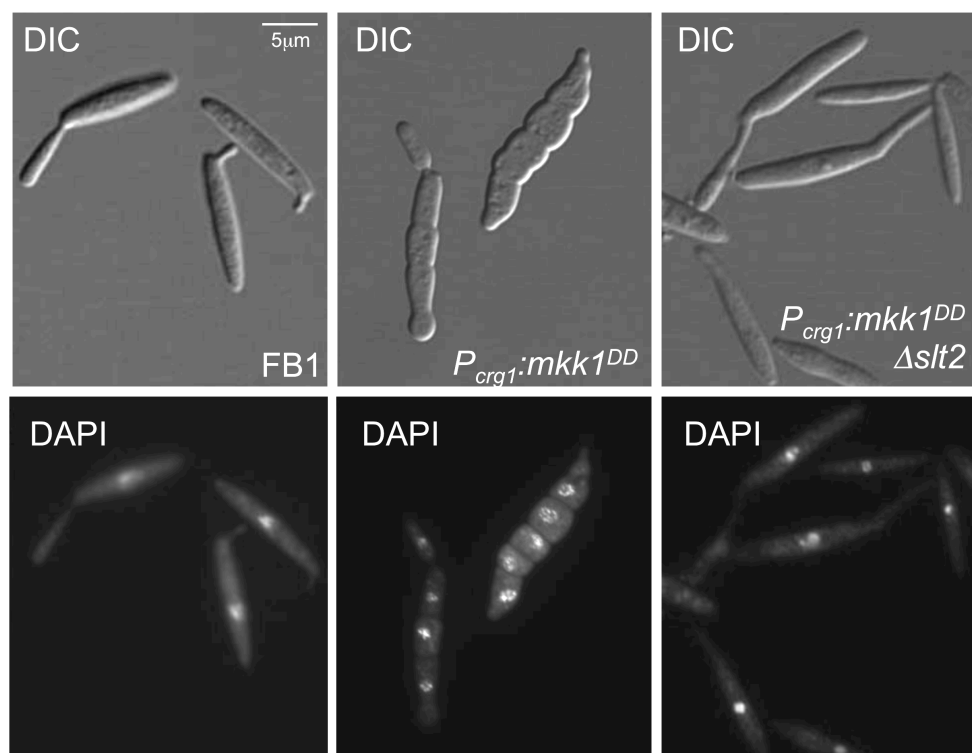
C



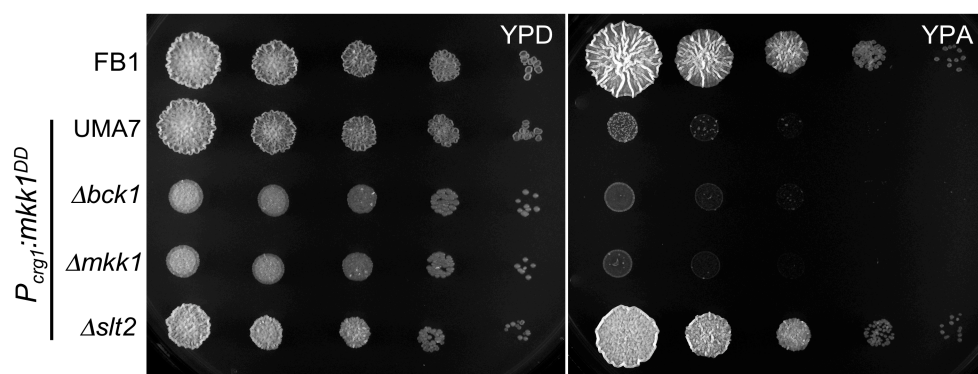
**Figura 32. La sobreexpresión del alelo  $mkk1^{DD}$  es tóxico para las células.** **A.** Esquema de la proteína Mkk1 donde se indica las sustituciones realizadas para la construcción de ganancia de función. **B.** Ensayo de sensibilidad en placa. Las estirpes FB1, UMA12 y UMA7 se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD e YPA. **C.** Morfología celular y tinción de septos con CFW. Las estirpes FB1, UMA12 y UMA7 se crecieron toda la noche en YPD (medio restrictivo). Luego los cultivos se lavaron y se transfirieron a medio permisivo YPA. Tras 8 horas se observó el fenotipo. Barra: 5 $\mu$ m.

De acuerdo con un modelo lineal de señalización, el efecto deletéreo observado con el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* debería ser consecuencia de una hiperactivación de la MAP quinasa Slt2. Por lo tanto, esta toxicidad se podría revertir en una estirpe carente de Slt2 pero no en ausencia de Bck1. Y esto fue lo que observamos cuando insertamos el alelo activo bajo el promotor *P<sub>crg1</sub>* en los fondos genéticos  $\Delta bck1$ ,  $\Delta mkk1$  y  $\Delta slt2$ . (Fig. 33).

**A**



**B**



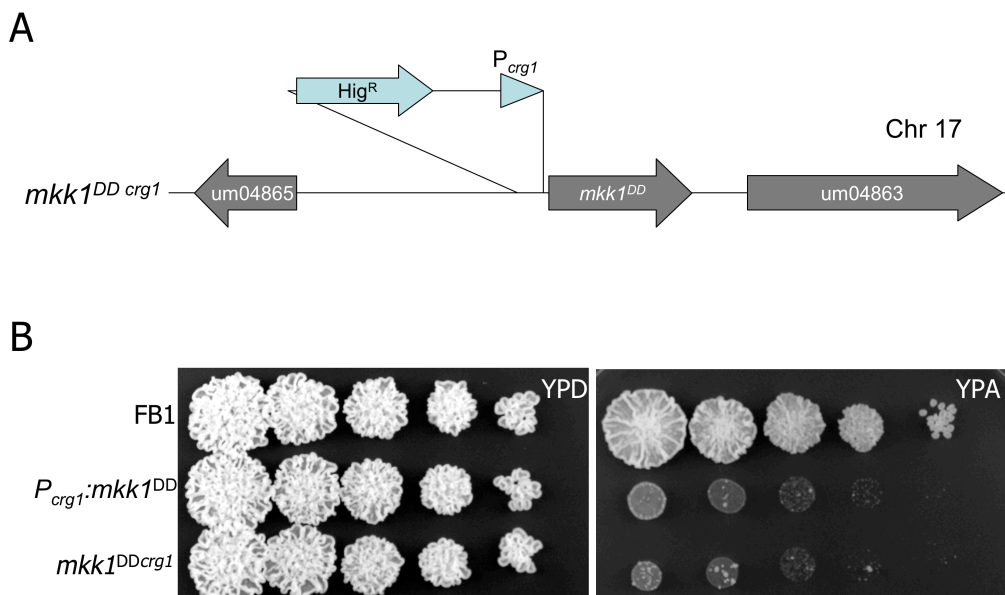
**Figura 33. El fenotipo inducido por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* se revierte en un mutante  $\Delta slt2$ .**

**A.** Morfología celular y tinción de núcleos con DAPI. Las estirpes FB1, UMA7 y UMA7 $\Delta slt2$  se crecieron toda la noche en CMD (medio restrictivo). Luego los cultivos se lavaron y se transfirieron a medio permisivo CMA. Tras 8 horas se observó el fenotipo. Barra: 5 $\mu$ m. **B.** Ensayo de sensibilidad en placa. Las estirpes FB1, UMA7, UMA7 $\Delta bck1$ , UMA7 $\Delta mkk1$  y UMA7 $\Delta slt2$  se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD e YPA.

Estos resultados nos indican que la inhibición del crecimiento producida por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* requiere de la presencia de Slt2. En otras palabras, que la hiperactivación de la cascada MAPK-Slt2 es tóxica para las células.

### 1.6 El efecto tóxico producido por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* requiere de la fosforilación y actividad quinasa de Slt2

De la misma manera que estudiamos la fosforilación de Slt2 en respuesta a estrés de pared, lo hicimos en respuesta al alelo hiperactivo *mkk1<sup>DD</sup>*. Para lo cual, necesitábamos expresar los alelos *HA-slt2<sup>AEF</sup>* y *HA-slt2<sup>KD</sup>* en un fondo *P<sub>crg1</sub>:mkk1<sup>DD</sup>* respectivamente. Pero, como ambas construcciones estaban diseñadas para insertarse en el mismo locus (locus *cbx*), construimos la estirpe UMA20, que expresa el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el control del promotor *P<sub>crg1</sub>* en su locus endógeno (Fig. 34 A). La estirpe UMA20 mostró el mismo fenotipo que la UMA7 (Fig. 34 B).

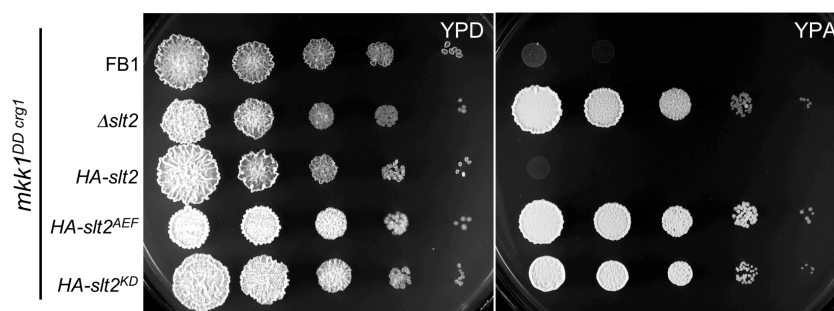


**Figura 34. El alelo condicional *mkk1<sup>DDcrg1</sup>* es tóxico para las células A.** Esquema de la construcción del alelo *mkk1<sup>DDcrg1</sup>*. **B.** Ensayo de sensibilidad en placa. Las estirpes FB1, UMA7 y UMA20 se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD e YPA.

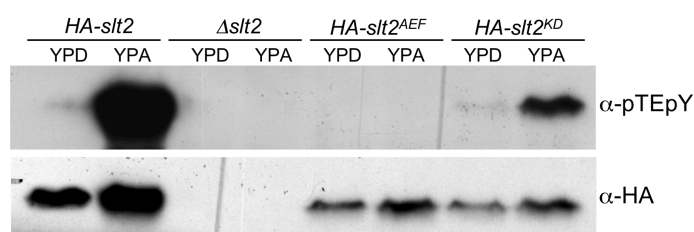
A continuación, analizamos los niveles de fosforilación de HA-Slt2, HA-Slt2<sup>AEF</sup> y HA-Slt2<sup>KD</sup> en un fondo *mkk1<sup>DDcrg1</sup>*. Como muestra la Figura 35 A hubo un aumento de la fosforilación de HA-Slt2 y HA-Slt2<sup>KD</sup> en medio inductor (YPA).

En cambio, en el alelo mutante HA-Slt2<sup>AEF</sup> no se observó fosforilación. Por otra parte, estas dos estirpes mutantes fueron capaces de rescatar el efecto tóxico provocado por la sobreexpresión del alelo *mkk1<sup>DDcrg</sup>* (Fig. 35 B).

A



B



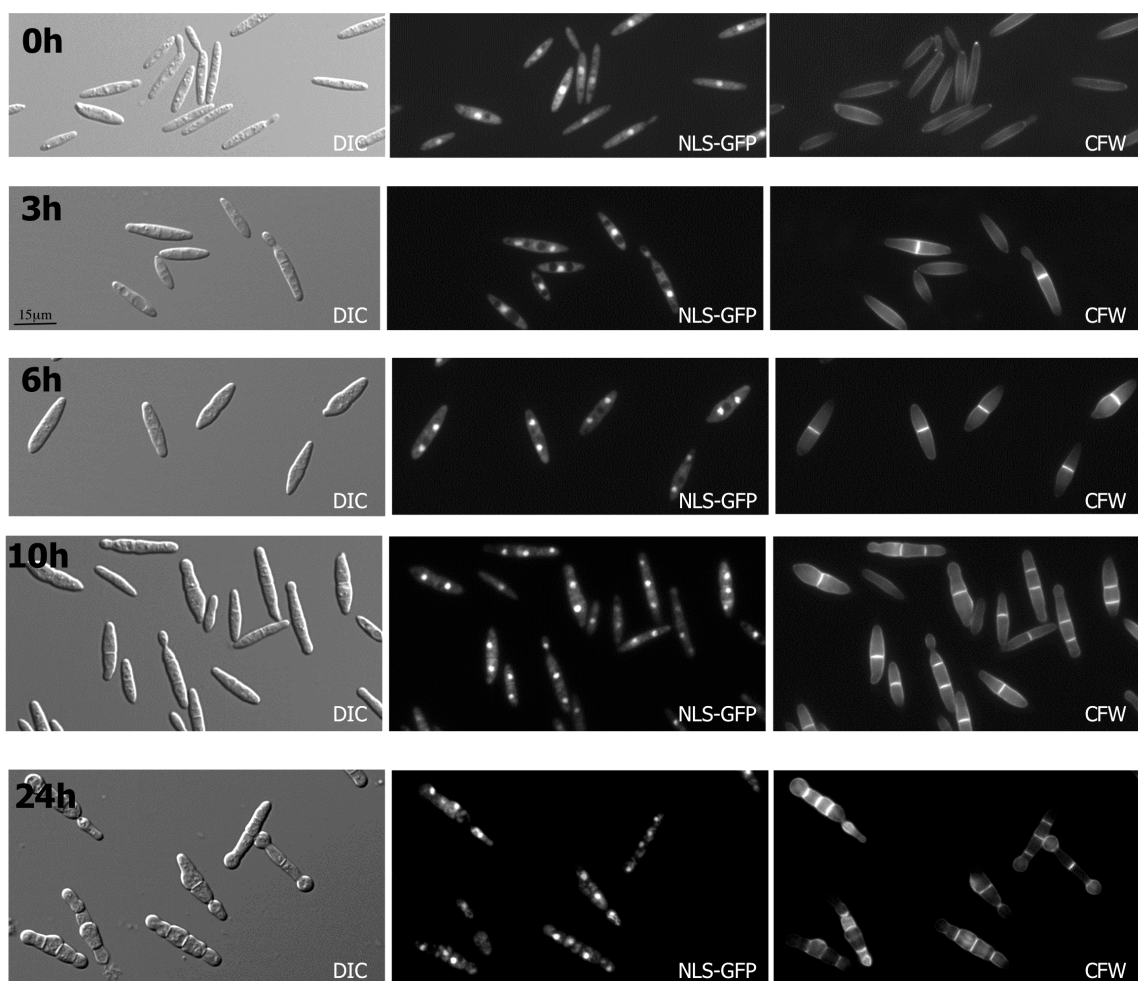
**Figura 35. La fosforilación y la actividad quinasa de Slt2 son necesarios para el efecto tóxico causado por el alelo *mkk1<sup>DDcrg1</sup>*.** **A.** Ensayo de sensibilidad en placa. Las estirpes UMA20, UMA42, UMA43, UMA64 y UMA65 se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD e YPA. **B.** Las estirpes UMA43, UMA42, UMA64 y UMA65 se crecieron toda la noche en YPD, luego se transfirieron a YPD e YPA. Luego de 8 horas se colectaron las células y se procesaron para *Western blot*. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo  $\alpha$ -p44/42MAPK y la cantidad total de Slt2 con el anticuerpo  $\alpha$ -HA.

Con estos resultados confirmamos que el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* es capaz de activar Slt2. Y demostramos que la fosforilación y la actividad quinasa de Slt2 son imprescindible para producir el defecto en crecimiento observado.

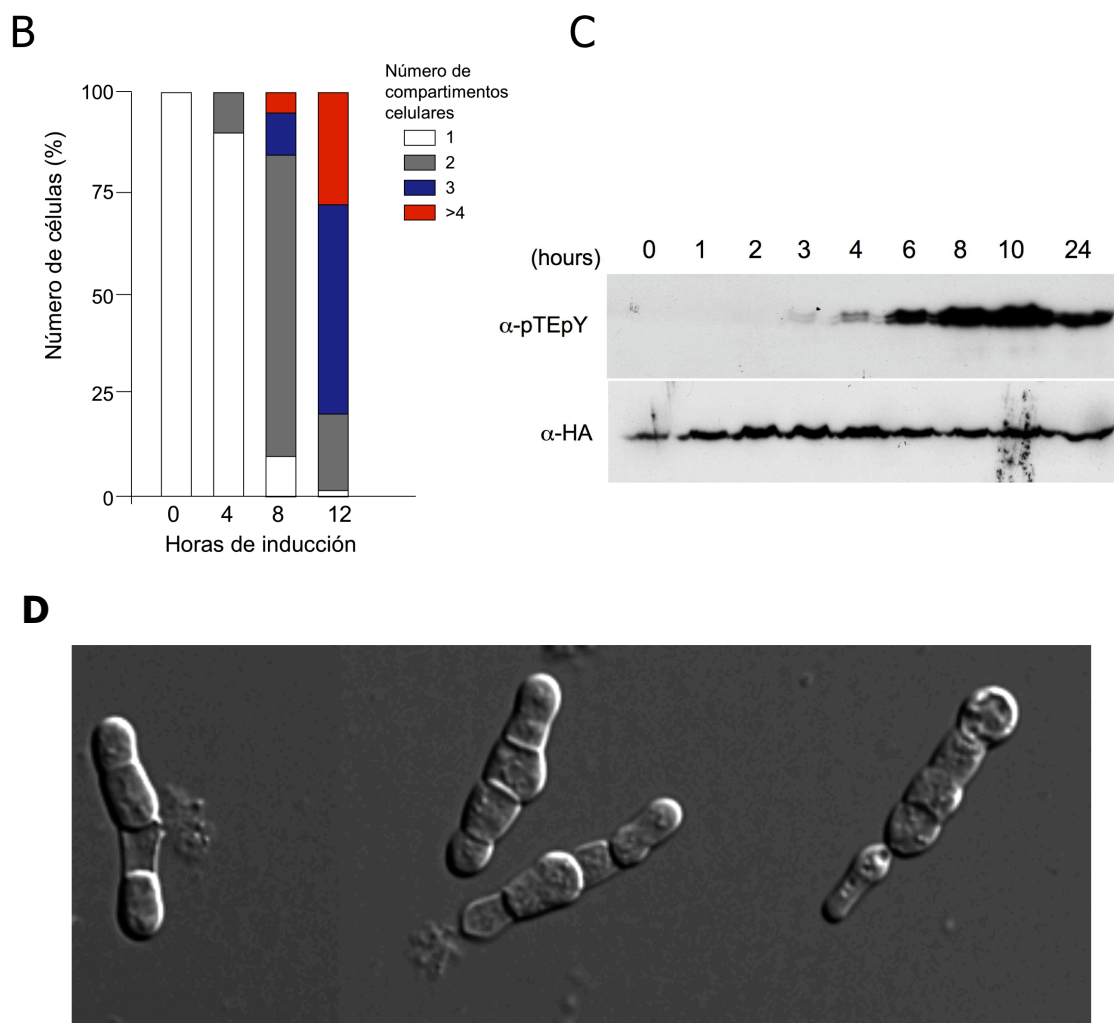
### 1.7 La activación de Slt2 produce células con múltiples compartimentos cada vez mas pequeños, de un solo núcleo

Una vez confirmado que el efecto tóxico causado por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* requiere de la activación de Slt2, nos planteamos descifrar la razón de este efecto letal. Comenzamos con un análisis detallado de la aparición del fenotipo en el tiempo. Para esto, crecimos la estirpe UMA20 (con HA-Slt2) en medio líquido CMA y sacamos muestras a distintos intervalos de tiempos para su

observación. Para poder cuantificar con claridad los núcleos se insertó en esta estirpe la secuencia de la proteína con fluorescencia verde fusionada a una secuencia de señalización nuclear (NLS-GFP). Al cabo de 3 horas en condiciones permisivas comenzamos a observar células que se redondeaban y dejaban de dividirse mediante la formación de gemas, características de la fase haploide de crecimiento de *U. maydis*, para dividirse mediante un septo en dos compartimentos con un núcleo cada uno. Pasadas las 6 horas de cultivo, alrededor del 70% de la población estaba formada por este tipo de agregados celulares con dos núcleos separados por un tabique (Fig. 36 A). Conforme pasaba el tiempo el número de compartimentos aumentaba y este aumento se correlacionó con un incremento de la fosforilación de Slt2 (Fig. 36 B y C).

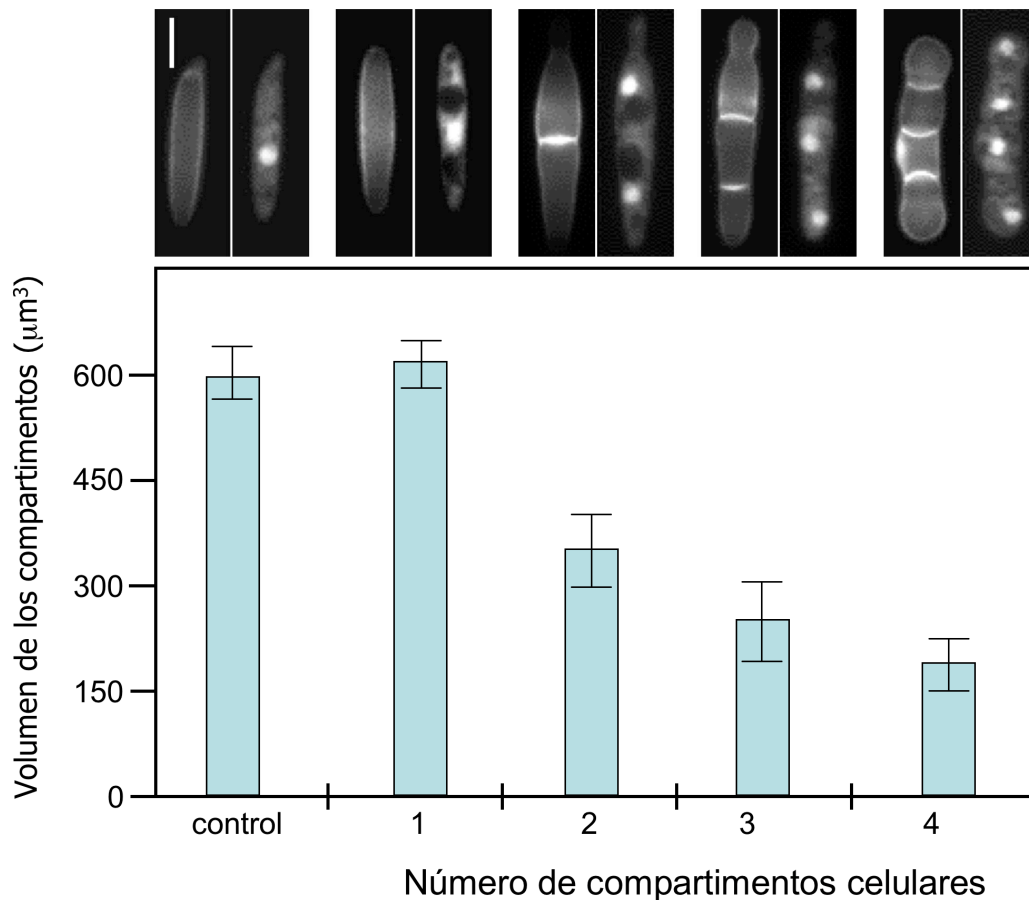
**A**





**Figura 36. La hiperactivación de Slt2 produce agregados celulares divididos por septos con un solo núcleo.** **A.** La estirpe UMA54 (*mkk1<sup>DDcrg1</sup>*, HA-slt2, NLS-GFP) se cultivó toda la noche en CMD, luego se transfirió a un medio inductor (CMA) y se creció durante 24 horas. Se tomaron muestras para *Western blot* y para observar el fenotipo a 0, 3, 6, 8, 10, 12 y 24 horas. Los septos se tiñeron con CFW y la señal GFP proviene de los núcleos. **B.** Representación gráfica del número de células (compartimentos) por agregado celular en función del tiempo de inducción. **C.** *Western blot* de las muestras tomada en A. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo  $\alpha$ -p44/42MAPK y la cantidad total de Slt2 con el anticuerpo  $\alpha$ -HA. **D.** Imagen de la estirpe UMA54 crecida en CMA por 24 horas.

Por otra parte, a medida que el número de septos aumentaba, los compartimentos celulares generados se hacían cada vez más pequeños. Sin embargo, el volumen total del agregado permanecía prácticamente invariable (Fig. 37).



**Figura 37. Los compartimentos celulares son cada vez más pequeños.** Gráfico del promedio del volumen celular de los compartimentos en función de la cantidad de compartimentos (células) por agregado celular. Barra:  $5\mu\text{m}$ .

Otro fenómeno curioso que observamos en varias de estas células fue los extremos completamente redondeados, lo que pensamos es una consecuencia de un crecimiento isotrópico. (Fig. 32 C y 36 A). Pasadas las 24 horas en condiciones permisivas los compartimentos comenzaron a romperse liberando todo el contenido de las células, lo que dio lugar progresivamente a la muerte del cultivo (Fig. 36 D).

## 2. Posibles proteínas diana de la ruta de integridad celular

### 2.1 *U. maydis* tiene un putativo factor de transcripción Rlm1

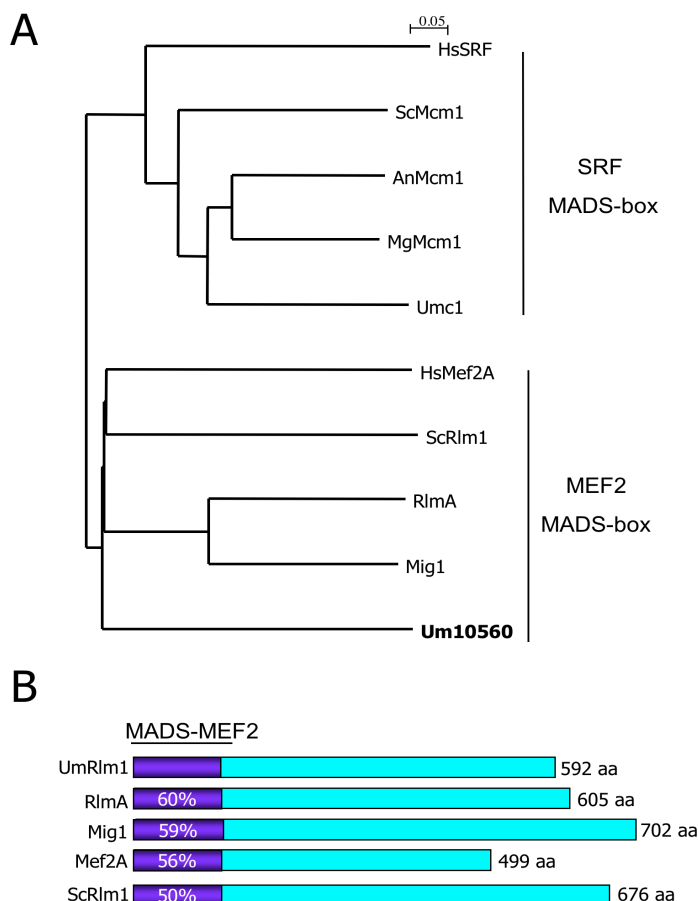
El factor de transcripción Rlm1 es responsable de la mayoría de respuestas de la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae* (Jung y Levin,



1999). El gen *rlm1* (*resistance to lethality of mkk1*<sup>P386</sup>) como su nombre lo indica, fue identificado en un análisis genético de mutantes que podían sobrevivir a la inhibición del crecimiento causada por la sobreexpresión de un alelo constitutivamente activo de Mkk1 (Watanabe et al., 1995).

Como nuestro objetivo era encontrar proteínas dianas de acción de Slt2 implicadas con el defecto en crecimiento, Rlm1 fue nuestro primer candidato. Comenzamos con una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con la proteína Rlm1 y encontramos dos secuencias pertenecientes a la superfamilia de reguladores transcripcionales MADS-box. Una de estas, es la proteína Umc1 que ha sido descrita en *U. maydis* (Kruger et al., 1997) y es similar a la proteína Mcm1p de *S. cerevisiae*. En otras especies de hongos filamentosos también se han identificado dos proteínas pertenecientes a la familia MADS-box (Damveld et al., 2005; Mehrabi et al., 2008). Un análisis filogenético mostró que Umc1 pertenece a la subfamilia de Factores de respuesta al suero de tipo I (SRF-like MADS-box). La otra secuencia que corresponde al marco de lectura abierto Um10560 se asocia junto con Rlm1 al grupo formado por la subfamilia Factor Amplificador de Miocitos 2 tipo II (MEF2-like MADS-box) (Fig. 38 A y Fig. 64 ANEXO 2). A partir de ahora, denominaremos a esta proteína como UmRlm1 o simplemente Rlm1.

El gen *rlm1* codifica para una proteína de 592 aminoácidos con un peso molecular de 61,9 KDa. Como las otras proteínas de esta familia UmRlm1 posee el dominio MADS-MEF2 en el extremo amino terminal. Este dominio se haya muy conservado entre los distintos miembros de la familia y contiene los dominios de unión a ADN y dimerización. Dentro de esta región, UmRlm1 presentó una identidad de secuencia del 50% con ScRlm1 y del 60% con RlmA (Fig 38 B). En cambio, el resto de la proteína fue mas variable y el porcentaje de identidad global fue del 18% para ScRlm1 y del 23% en el caso de RlmA.

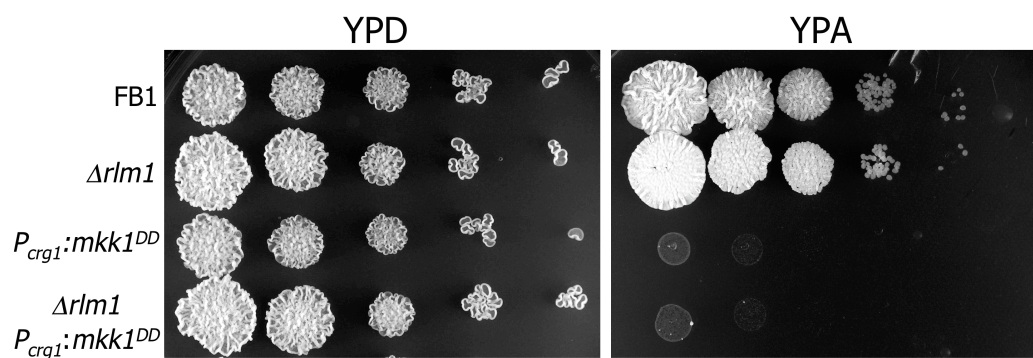
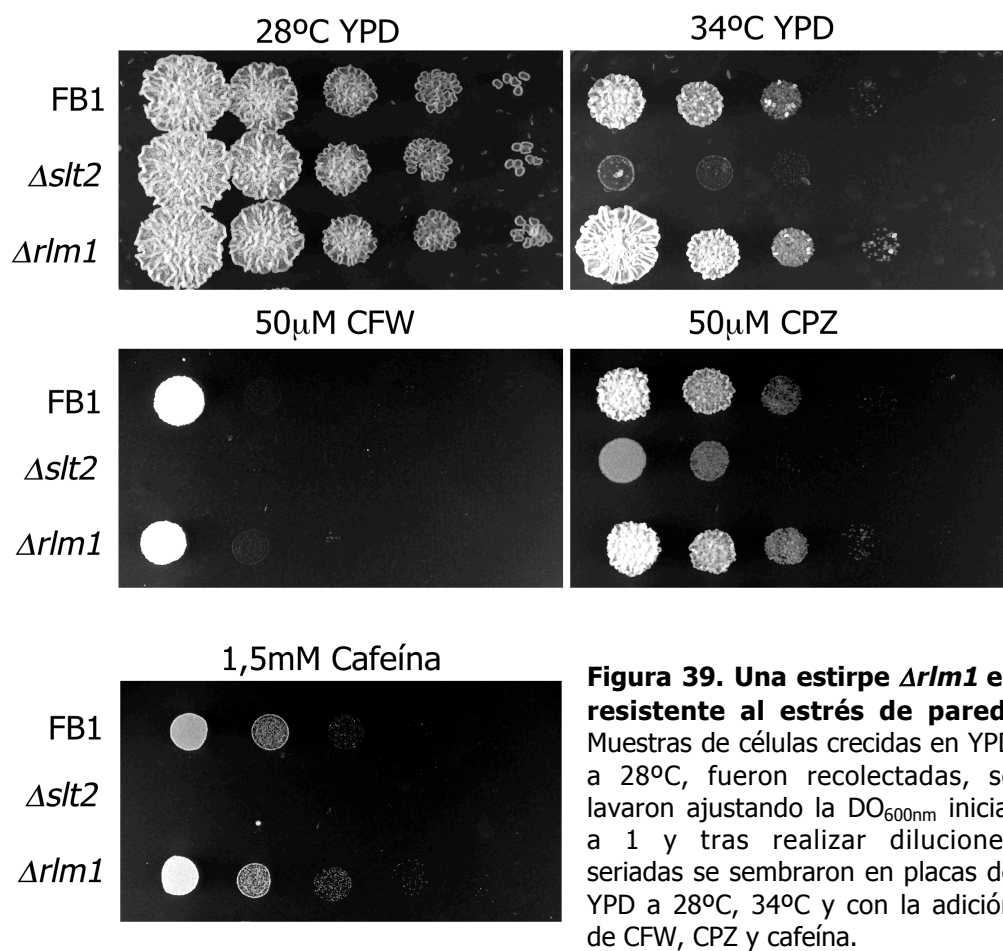


**Figura 38. El gen *r/m1* codifica para una proteína del tipo MEF2-MADS-box. A.** Dendrograma de las proteínas de la familia MADS-box de *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *A. nidulans*, *M. grisea* y *U. maydis* construido utilizando el método ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>). **B.** Esquema de las proteínas pertenecientes a la subfamilia MEF2-MADS-box indicando el dominio y los porcentajes de identidad aminoácídica de las proteínas cuando se compara con el dominio de *U. maydis*.

### La ausencia de Rlm1 no revierte el fenotipo inducido por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>*

A continuación analizamos el efecto de la pérdida de función de esta proteína en *U. maydis*. Para ello se sustituyó la secuencia codificante de *r/m1* por el marcador que confiere resistencia a higromicina. La estirpe resultante fue viable y se comportó como una estirpe silvestre. A diferencia de lo observado con las estirpes deficientes en las MAP quinasas, el mutante  $\Delta r/m1$  creció igual que la estirpe silvestre a elevada temperatura y no fue mas sensible al CFW, CPZ o cafeína (Fig. 39).

Lo siguiente, fue comprobar si una estirpe carente en Rlm1 podía resistir el efecto tóxico causado por la sobreexpresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>*. Para lo cual, expresamos el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el promotor *Pcrg1* en la estirpe carente de Rlm1. Como muestra la Figura 40 la falta de Rlm1 no rescata el fenotipo de muerte en condiciones permisivas (YPA).

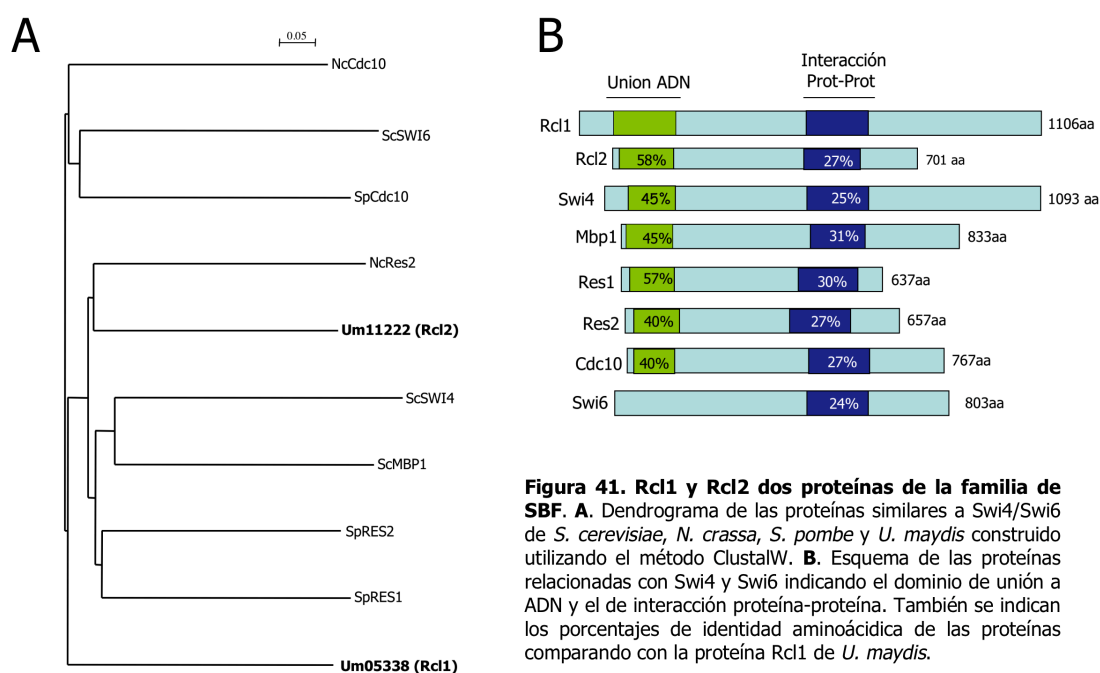


**Figura 40. El mutante  $\Delta rlm1$  no revierte el fenotipo del alelo  $mkk1^{DD}$ .** Ensayo de sensibilidad en placa. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD e YPA.

## 2.2 *U. maydis* posee un putativo homólogo de SBF

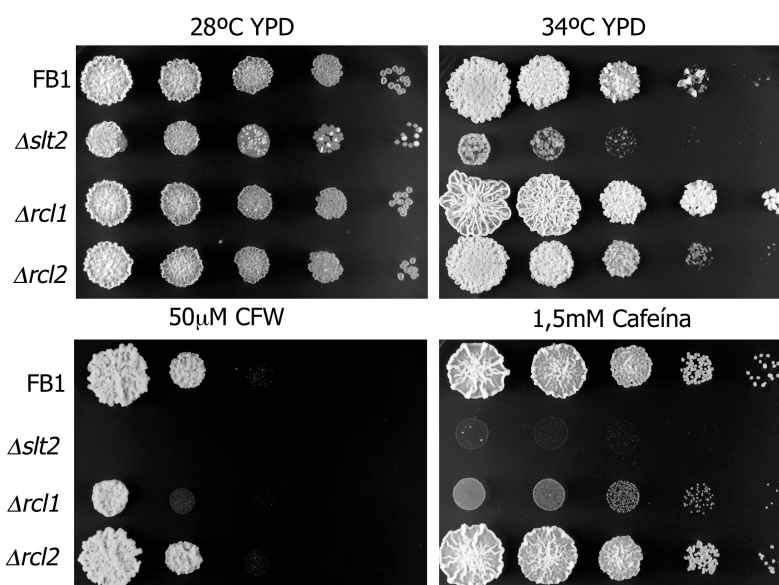
En *S. cerevisiae* otra proteína blanco de acción de Slt2 es el complejo transcripcional SBF. SBF esta constituido por la subunidad reguladora Swi6 y una proteína de unión a ADN Swi4 (Breedon, 2003). El factor de transcripción SBF se activa en la transición G1/S regulando entre otros la expresión de los genes propios de la fase G1 del ciclo celular CLN1 y CLN2 (Moffat y Andrews, 2004). Además, SBF también participa en la inducción de genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular (Igual *et al.*, 1996).

Con objeto de averiguar si en *U. maydis* existía un complejo similar, posible blanco de la ruta de integridad celular que rescatara a la células del fenotipo tóxico causado por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>*, realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con otras proteínas de esta familia. Identificamos dos posibles pautas abiertas de lectura um05338 y um11222 cuyas traducciones definen dos proteínas de 1106 y 701 aminoácidos, que hemos denominado Rcl1 y Rcl2 respectivamente. Rcl1 y Rcl2 tienen gran similitud con las proteínas Swi4, Swi6 y Mbp1 de *S. cerevisiae* y Cdc10, Res1 y Res2 de *S. pombe*. Poseen en el extremo amino terminal un dominio de unión a ADN (superfamilia Kila) y un dominio de interacción proteína-proteína (Fig. 41 y Fig. 65 ANEXO 2).



### **Rcl1 es un putativo blanco de la ruta de integridad celular dispensable para producir el efecto tóxico**

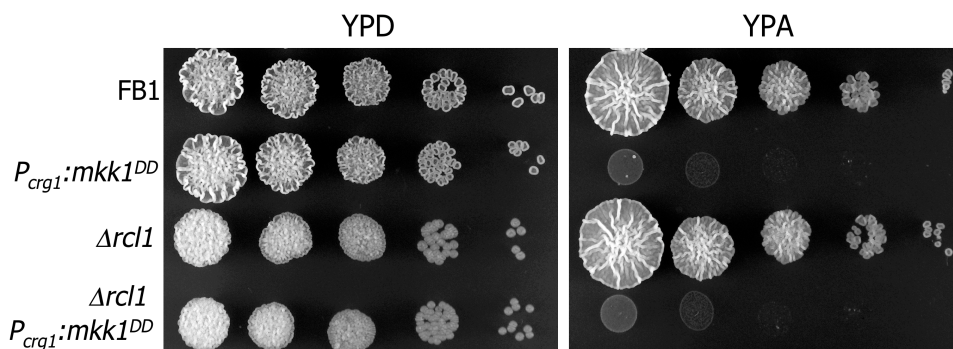
Rcl2 se agrupa junto con Swi4, en cambio Rcl1 queda por fuera de este grupo en una rama independiente. Por lo que consideramos que en *U. maydis* un heterodímero Rcl2/Rcl1 podría cumplir una función similar al complejo SBF (Swi4/Swi6) de *S. cerevisiae*. Comenzamos analizando los efectos de la pérdida de función de Rcl1 y Rcl2. Para ello, se reemplazó el gen *rcl1* por el gen que confiere resistencia a higromicina. Y en el otro caso se reemplazó el gen *rcl2* por el gen de resistencia a carboxina. La pérdida de función en estas proteínas no afectó la capacidad de proliferación de las células. Sin embargo, la estirpe  $\Delta rlc1$  fue levemente mas sensible a CFW y cafeína y mostró mayor resistencia al aumento de temperatura que la estirpe silvestre. La estirpe  $\Delta rlc2$  no presentó diferencias en su espectro de sensibilidad (Fig. 42).



**Figura 42. Espectro de sensibilidad de Rcl1 y Rcl2.** Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD a 28°C, 34°C y con la adición de CFW y cafeína.

La sensibilidad al CFW y cafeína de la estirpe  $\Delta rlc1$  sugiere una relación con la ruta de integridad, no así la resistencia al aumento de la temperatura. Igualmente insertamos en esta estirpe mutante  $\Delta rlc1$ , el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el promotor *Pcrg1*. Como muestra la Figura 43 la ausencia de Rcl1 no revierte el

fenotipo inducido por la sobreexpresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* en medio permisivo YPA.



**Figura 43. El mutante  $\Delta rc11$  no revierte el fenotipo del alelo *mkk1<sup>DD</sup>*.** Ensayo de sensibilidad en placa. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD e YPA.

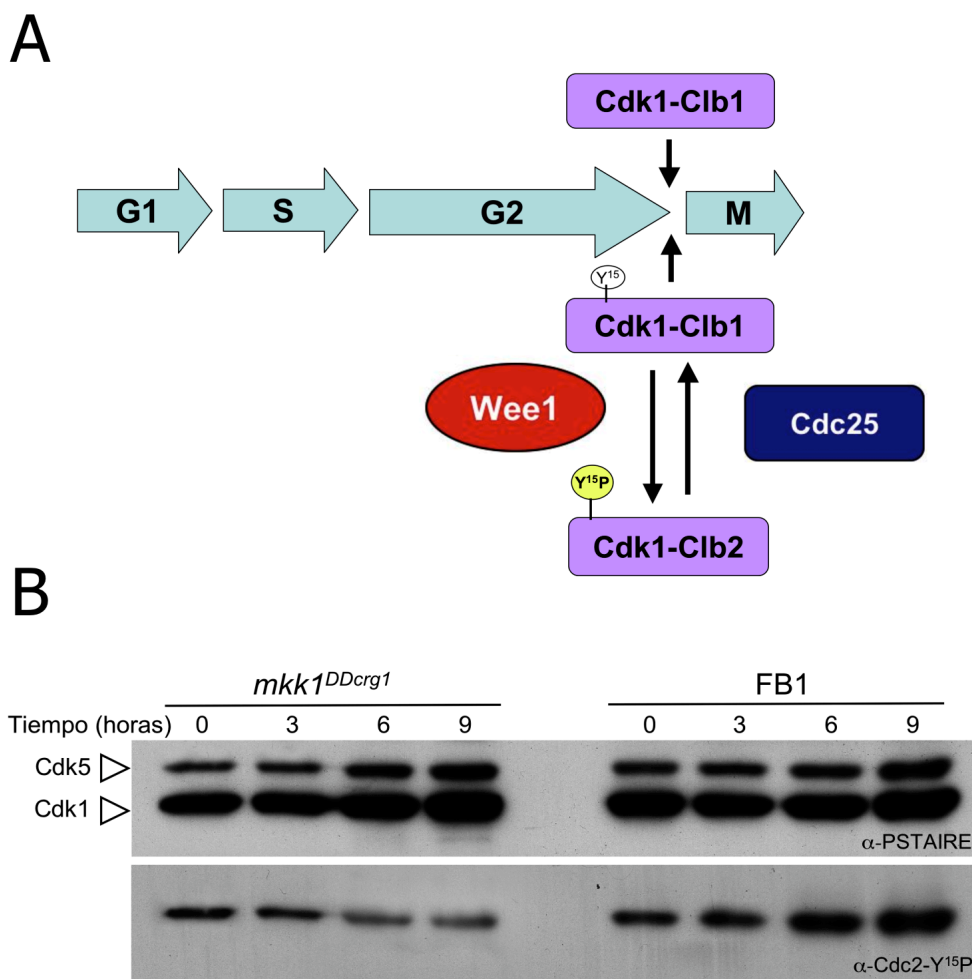
### 2.3 La transición G2/M como blanco de acción

El fenotipo producido por la expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* nos recordaba al descrito para células en ausencia de Wee1 ó que sobreexpresan Cdc25, donde el paso no regulado de la fase G2 a M del ciclo celular resulta en cadenas de células redondeadas, que no geman sino que están divididas por septos en compartimientos con un solo núcleo (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005ab). La transición G2/M es regulada por fosforilación inhibitoria del complejo Cdk1/Clb2 efectuada por la quinasa Wee1. Esta fosforilación se revertir por acción de la fosfatasa Cdc25 (Fig. 44 A). Así, tanto la represión de Wee1 como la sobreexpresión de Cdc25 provocan una entrada rápida en mitosis, debido a un acortamiento de la fase G2, asociado a una caída en los niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1. Esto genera células cada vez mas pequeñas que al no poseer el tiempo necesario para gemar se dividen por septos en compartimientos que permanecen unidos (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005ab).

Tomando en cuenta los resultados anteriores y considerando la similitud en los fenotipos, nos planteamos la siguiente hipótesis: la hiperactivación de la ruta de integridad celular promueve un acortamiento de la fase G2. Si esto fuera así, una estirpe que sobreexpresen el alelo *mkk1<sup>DD</sup>*, debería presentar una caída en los niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1 con respecto a una



estirpe silvestre en las mismas condiciones. Para comprobarlo analizamos mediante *Western blot* los niveles de Cdk1 y Cdk1 fosforilada en extractos obtenidos a partir de dos estirpes (una que porta el alelo y otra que no) cultivadas en condiciones permisivas. Efectivamente, los niveles de fosforilación de Cdk1 fueron mas bajos en la estirpe que expresaba el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* (Fig. 44 B).



**Figura 44. La expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* disminuye la fosforilación inhibitoria de la Cdk1.** **A.** Esquema de los principales reguladores de la transición G2/M en *U. maydis*. **B.** La estirpe control y la UMA20 se crecieron en YPD toda la noche, luego se transfirieron a YPA y se colectaron muestras a las 0, 3, 6 y 9 horas para *Western blot*. Las Cdk se revelaron con el anticuerpo  $\alpha$ -PSTAIR. La banda superior corresponde a Cdk5 de *U. maydis*, homólogo a Pho85 de *S. cerevisiae*. La fosforilación en la tirosina 15 se analizó con el anticuerpo  $\alpha$ -Cdc2-Y<sup>15</sup>P.

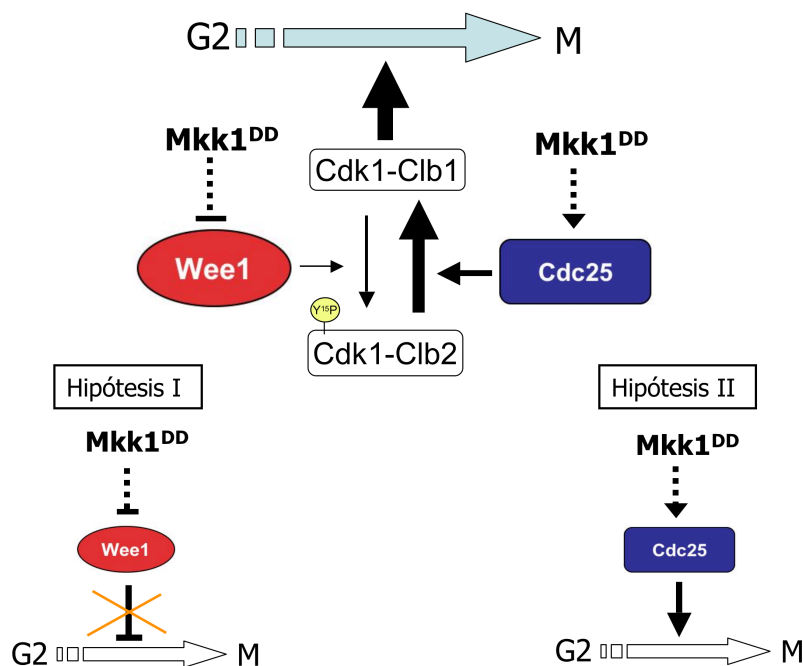
Este resultado sugiere que la activación constitutiva de Slt2 de alguna manera consigue disminuir la fosforilación inhibitoria de Cdk1 promoviendo la entrada en mitosis.

## 2.4 Cdc25 una posible diana de la ruta de integridad celular en *U. maydis*

Como la hiperactivación de la ruta de integridad fuerza a las células de alguna u otra manera a entrar antes en mitosis generando células cada vez mas pequeñas, la diana final de este proceso debe ser una proteína reguladora de la transición G2/M. En *U. maydis* esta transición esta principalmente regulada por el grado de fosforilación del complejo Cdk1/Clb2 y a su vez la actividad de este complejo esta determinada por la acción de Wee1 y Cdc25.

En el caso de que la diana fuera Wee1, entonces la expresión de *mkk1<sup>DD</sup>* debería inhibir a esta quinasa para reducir la fosforilación inhibitoria sobre el complejo Cdk1/Clb2 y promover la entrada en mitosis (Fig. 45 Hipótesis I). En este supuesto caso, tal vez, el aumento de la actividad de Wee1 podría rescatar a las células del efecto tóxico causado por la hiperactivación de la ruta.

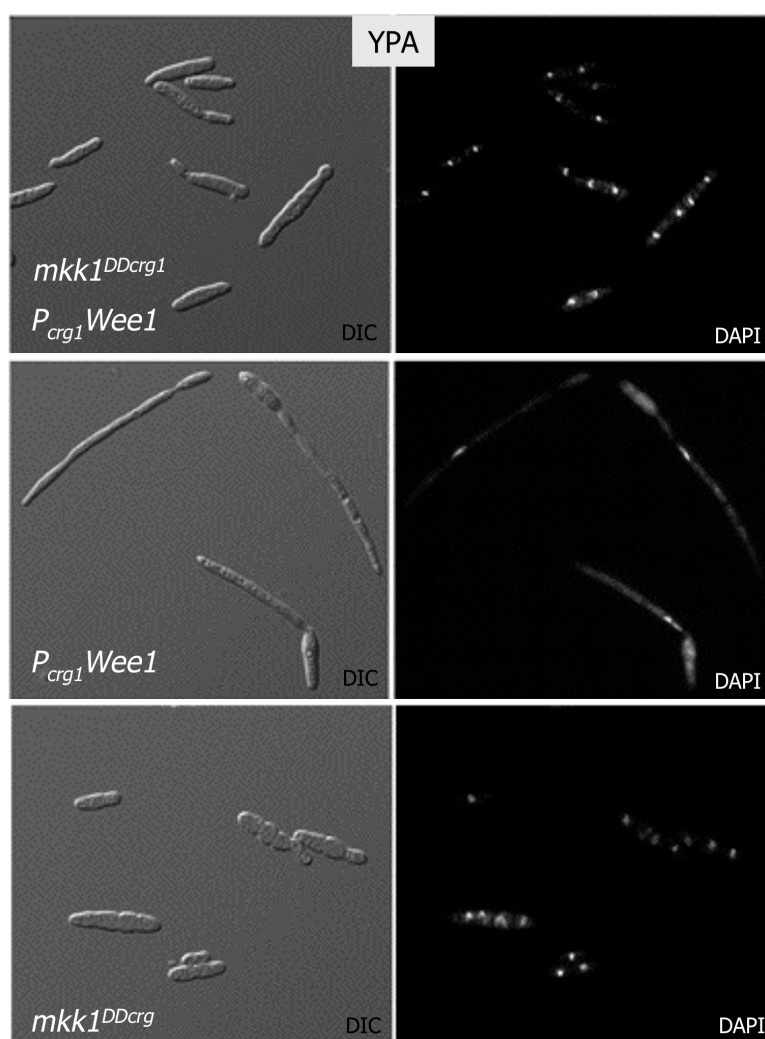
Por otra parte, si Cdc25 fuera el blanco de acción, *Mkk1<sup>DD</sup>* debería activar la fosfatasa de modo de revertir la fosforilación inhibitoria sobre el complejo Cdk1/Clb2 para promover la entrada en mitosis (Fig. 45 Hipótesis II). Si esto fuera así, en este caso la ausencia de Cdc25 podría revertir el fenotipo observado.



**Figura 45. Posibles interacciones de *Mkk1<sup>DD</sup>* con elementos del ciclo.** Esquema donde se representan dos hipótesis de actuación.



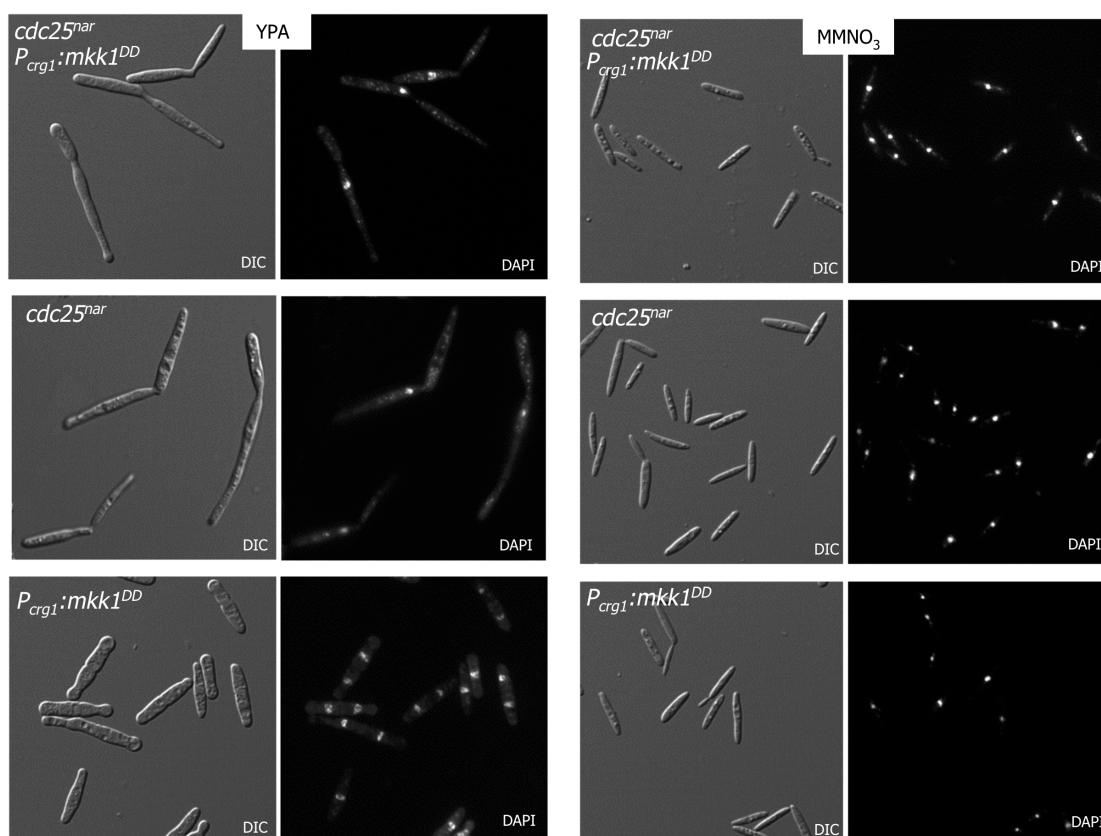
Para corroborar la hipótesis I, nos planteamos el siguiente experimento: introducir una copia ectópica del gen *wee1* bajo el promotor regulable *P<sub>crg1</sub>* en la estirpe UMA20 que porta el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* bajo el mismo promotor. De este modo en un medio con arabinosa encendemos los dos promotores a la vez pudiendo responder a la pregunta de si un aumento de la actividad de Wee1 es capaz de revertir el fenotipo generado por la sobreexpresión de Mkk1<sup>DD</sup>. Como se muestra en la Figura 46 cuando sobreexpresamos solamente *wee1* observamos células con gemas muy largas paradas en ciclo en fase G2 (Sgarlata y Perez-Martin, 2005b). En cambio, cuando encendemos *mkk1<sup>DD</sup>* el fenotipo predominante fue el de las células divididas en compartimentos con un solo núcleo. Lo que indica que la predicción de nuestra hipótesis I no es correcta.



**Figura 46. Hipótesis I.** Morfología celular y tinción de núcleos con DAPI. Las estirpes UMA79, UMC48 y UMA20 se crecieron toda la noche en YPD (medio restrictivo). Luego los cultivos se lavaron y se transfirieron a medio permisivo YPA. Tras 8 horas se observó el fenotipo.

Para probar la hipótesis II, utilizamos una estirpe condicional de Cdc25 donde el promotor de *cdc25* fue reemplazado por el promotor regulable por fuente de nitrógeno *Pnar1* (Sgarlata y Perez-Martin, 2005a). Esta estirpe crecida en condiciones restrictivas presenta un fenotipo similar al observado en la sobreexpresión de Wee1. En este fondo genético insertamos el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* regulado por el promotor *Pcrg1*. y analizamos el fenotipo en medio líquido YPA. En estas condiciones donde Cdc25 esta apagado y Mkk1<sup>DD</sup> encendido, observamos que el fenotipo predominante fue el de las células con un solo núcleo y gemas largas característico de la ausencia de Cdc25 (Fig. 47). Este resultado apoya nuestra hipótesis II donde se predice que la ausencia de Cdc25 podría revertir el fenotipo producido por la sobreexpresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>*.

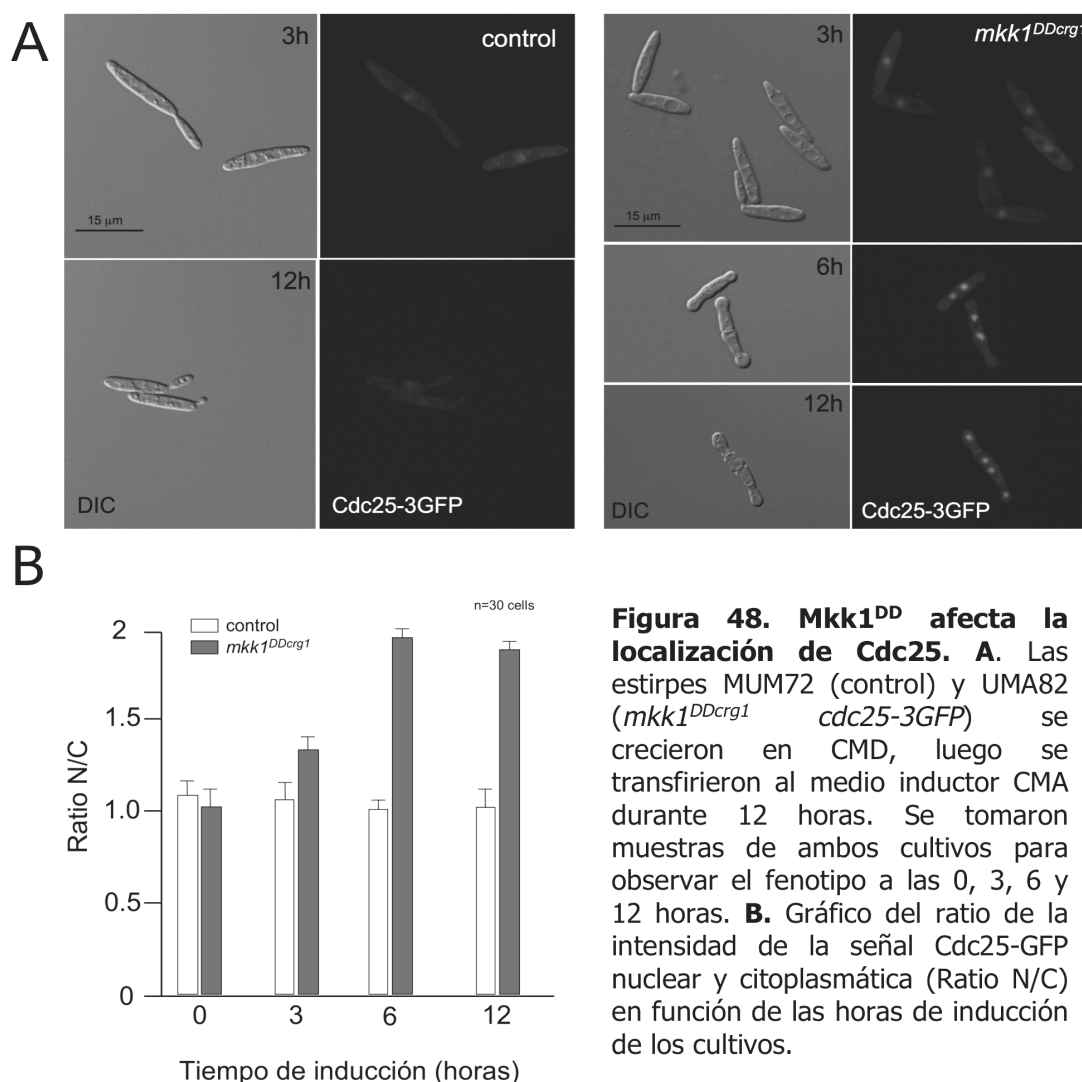
En conjunto, estos dos resultados sugieren que la hiperactivación de la ruta de integridad promueve la entrada rápida en mitosis actuando principalmente por encima de Cdc25.



**Figura 47. Hipótesis II.** Morfología celular y tinción de núcleos con DAPI. Las estirpes UMA56, UMC27 y UMA20 se crecieron toda la noche en MMNO<sub>3</sub>D (medio permisivo para Cdc25 y restrictivo para Mkk1<sup>DD</sup>). Luego los cultivos se lavaron y se transfirieron a medio MMNO<sub>3</sub>D e YPA (medio permisivo para Mkk1<sup>DD</sup> y restrictivo para Cdc25). Tras 8 horas se observó el fenotipo.

## La localización nuclear de Cdc25 aumenta con la expresión del alelo *mkk1<sup>DD</sup>*

Dados los resultados anteriores, consideramos que el estudio de la localización de Cdc25 en condiciones de inducción del alelo *mkk1<sup>DD</sup>* podría contribuir a una mejor comprensión de los efectos provocados por la hiperactivación de la ruta. Para ello utilizamos una estirpe que portaba la proteína con fluorescencia verde fusionada a Cdc25 (Cdc25-3GFP). Cdc25-GFP en condiciones normales se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma independientemente de la fase del ciclo celular (Fig. 48). Cuando se introdujo en esta estirpe la construcción *Pcrg:mkk1<sup>DD</sup>* se observó un incremento en la señal fluorescente en el núcleo tras 6 horas en condiciones de inducción de *mkk1<sup>DD</sup>* (Fig. 48).



**Figura 48. Mkk1<sup>DD</sup> afecta la localización de Cdc25.** **A.** Las estirpes MUM72 (control) y UMA82 (*mkk1<sup>DDcrg1</sup> cdc25-3GFP*) se crecieron en CMD, luego se transfirieron al medio inductor CMA durante 12 horas. Se tomaron muestras de ambos cultivos para observar el fenotipo a las 0, 3, 6 y 12 horas. **B.** Gráfico del ratio de la intensidad de la señal Cdc25-GFP nuclear y citoplasmática (Ratio N/C) en función de las horas de inducción de los cultivos.

### **3. Modulo de regulación superior**

#### **3.1 Identificación de las proteínas Rhos en *U. maydis***

La familia de GTPasas Rho/Rac constituyen un subgrupo numeroso dentro de la superfamilia de proteínas Ras. Estas proteínas controlan una amplia variedad de procesos celulares, ya que conectan la activación de receptores de membrana con múltiples rutas de señalización.

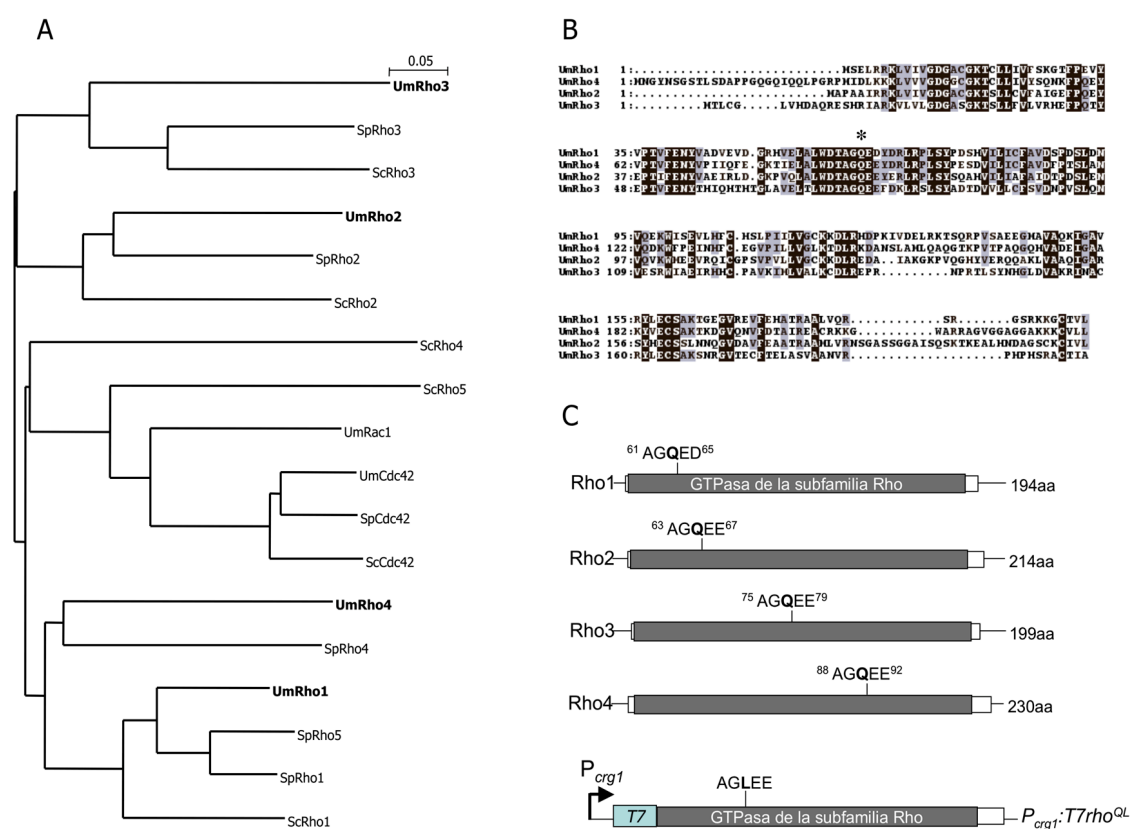
Rho1 se considera el regulador maestro de la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae* porque recibe e integra la mayoría de las señales provenientes de los receptores de membrana. Esta proteína G monomérica unida al GTP activa a la proteína quinasa C (PKC1) y esta a su vez activa a Bck1 iniciando la cascada MAP quinasa. Sin embargo, en *S. pombe* es la GTPasa Rho2 la que actúa por encima de Pck2 (homólogo de PKC1) para activar el modulo MAP quinasa.

En una búsqueda *in silico* en el genoma de *U. maydis* identificamos 6 GTPasas Rho/Rac: Rho1 (Um05734), Rho2 (Um02494), Rho3 (Um04070), Rho4 (Um03769), Cdc42 y Rac1 (Fig 49 y Fig. 67 ANEXO 2). Únicamente Cdc42 y Rac1 han sido caracterizadas y estudiadas en profundidad (Mahlert et al., 2006).

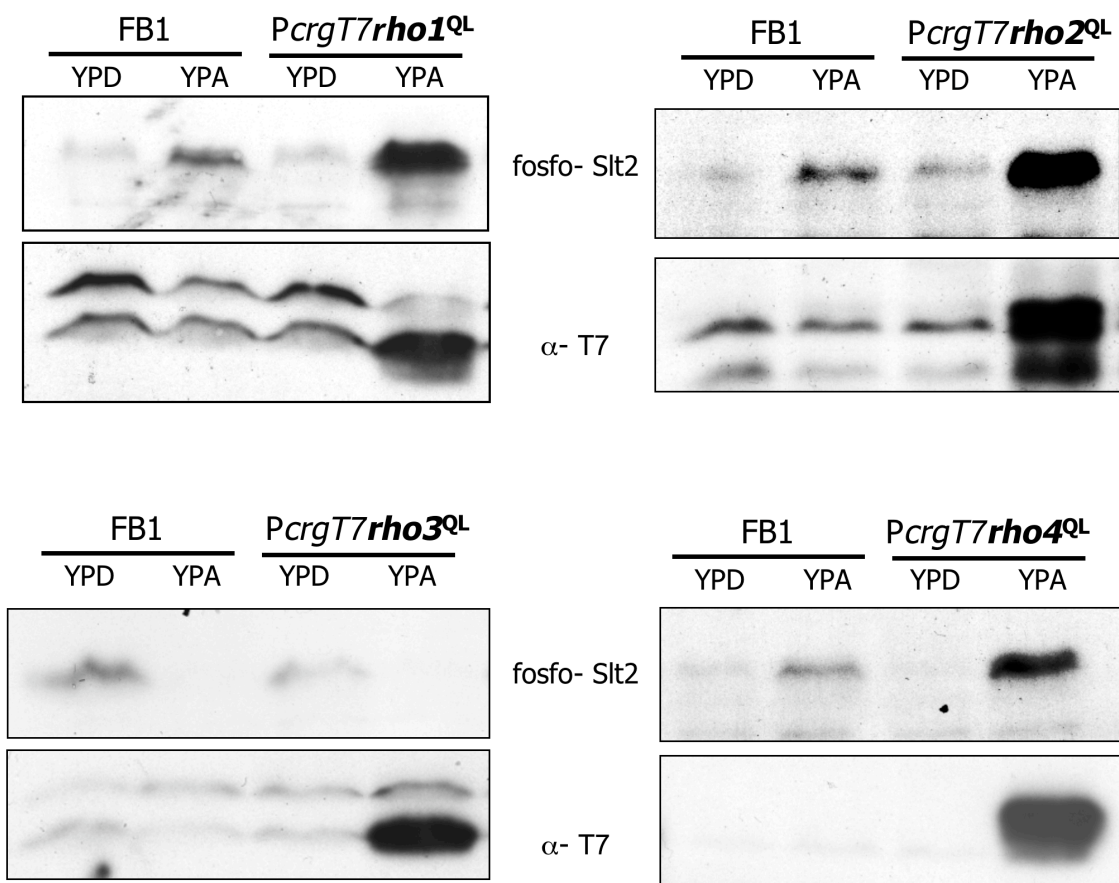
#### **3.2 Rho1, Rho2 y Rho4 posibles activadores de la cascada MAP quinasa**

Con objeto de averiguar cual de estas proteínas Rho era capaz de activar la cascada Slit2-MAP quinasa en *U. maydis*, decidimos hacer el siguiente abordaje. Generar variantes constitutivamente activas de las proteínas Rho reguladas por fuente de carbono, sobreexpresar estos alelos y ver cual de ellos era capaz de fosforilar a Slit2. Para esto, se generó una mutación puntual de una glutamina por una leucina para cada una de las proteínas. Esta sustitución (Q63L, Q65L, Q77L y Q90L) que se ha descrito para otras proteínas G, impide la hidrólisis del GTP forzando a las GTPasas a permanecer en un estado activo (Mahlert et al., 2006; Regenfelder et al., 1997). Estas variantes activas *rho1<sup>QL</sup>*, *rho2<sup>QL</sup>*, *rho3<sup>QL</sup>* y *rho4<sup>QL</sup>* se pusieron bajo el control del promotor *Pcrg1*, y se

insertaron en el locus de la *cbx*. Para poder hacer un seguimiento de las proteínas se les fusionó la secuencia que codifica el epítipo T7 (Fig.49). Estas estirpes se crecieron en YPA (condiciones permisivas) el tiempo necesario para observar la proteína en un *Western blot*. Las estirpes que portaban los alelos *rho1<sup>QL</sup>*, *rho2<sup>QL</sup>* y *rho4<sup>QL</sup>* mostraron un aumento en la fosforilación de Slt2. En cambio la expresión de *rho3<sup>QL</sup>* no afectó el nivel de fosforilación de la MAP quinasa (Fig. 50).



**Figura 49. *U. maydis* posee 6 GTPasas Rho/Rac.** **A.** Dendrogramas de las proteínas G monoméricas Rho/Rac de *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, construido utilizando el método ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>). **B.** Alineamiento de las proteínas Rho de *U. maydis*. En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los similares. El asterisco indica la glutamina (Q) que se sustituyó por leucina (L) en las variantes constitutivamente activas Rhos<sup>QL</sup>. **C.** Esquema de las proteínas Rho1, Rho2, Rho3 y Rho4 donde se indica las sustituciones realizadas para la construcción de las variantes constitutivamente activas.



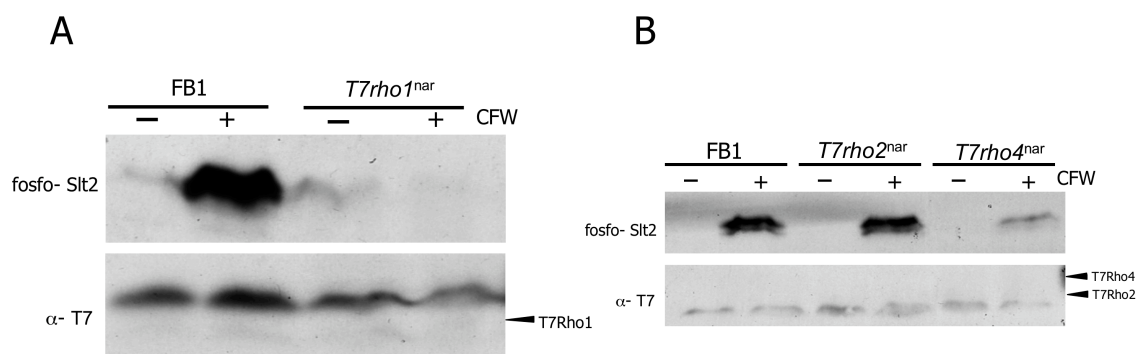
**Figura 50. Rho1<sup>QL</sup>, Rho2<sup>QL</sup> y Rho4<sup>QL</sup> inducen la fosforilación de Slt2.** Las estirpes FB1, Rho1<sup>QL</sup>, Rho2<sup>QL</sup>, Rho3<sup>QL</sup> y Rho4<sup>QL</sup> se crecieron en YPD, luego se lavaron y se transfirieron a YPD e YPA durante 10 horas (Rho1<sup>QL</sup> y Rho3<sup>QL</sup>) y 6 horas (Rho2<sup>QL</sup> y Rho4<sup>QL</sup>). Finalmente se colectaron las muestras para *Western blot*. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo α-p44/42MAPK y la expresión de las variantes activas con el anticuerpo α-T7.

### 3.3 Rho1, posible regulador superior de la cascada

A continuación, debíamos diferenciar cual de estos tres candidatos a reguladores superiores, ejercían un efecto directo sobre la cascada MAP quinasa. Una forma de demostrarlo, sería activando la ruta con CFW en ausencia Rho1, Rho2 ó Rho4 y ver si en alguna de estas estirpes desaparecía la fosforilación de Slt2. Conocíamos de trabajos previos del laboratorio, que Rho1 era esencial. Por lo cual decidimos construir estirpes condicionales de Rho1, Rho2 y Rho4 intercambiando el promotor endógeno por el promotor *Pnar*, que se activa en presencia de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y se apaga en NH<sub>4</sub><sup>-</sup>. El tratamiento con CFW en condiciones restrictivas (YPD) induce la fosforilación de Slt2 en una estirpe silvestre y esta fosforilación desaparece en ausencia de Rho1 (Fig. 51 A).

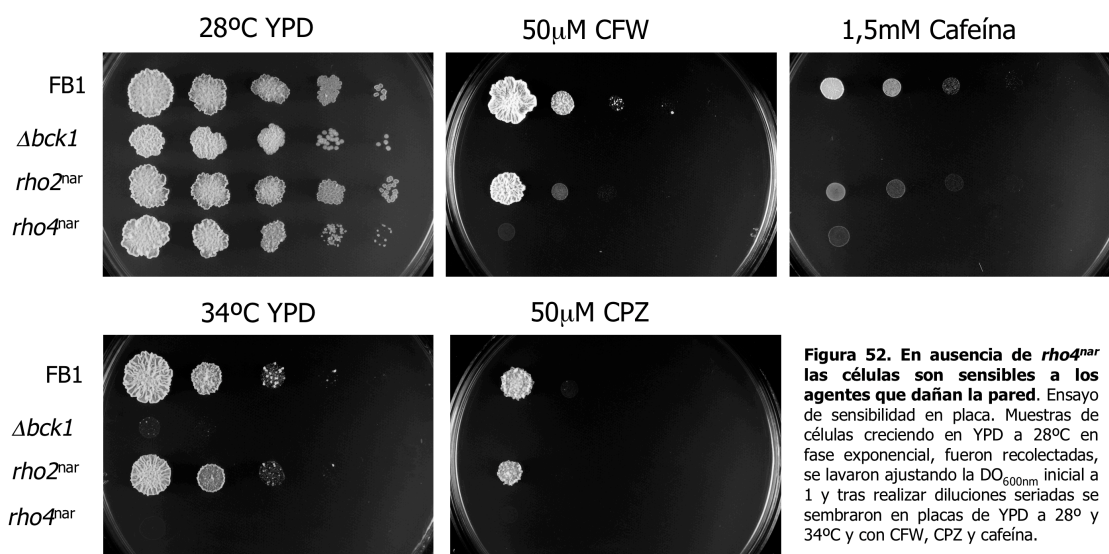


Cuando apagamos Rho2 la señal de activación es igual a la de la estirpe silvestre y en ausencia de Rho4 disminuye pero no desaparece (Fig. 51 B).



**Figura 51. Rho1 y Rho4 están involucrados en la activación de Slt2 en respuesta al CFW.** **A.** La estirpe silvestre y la condicional para Rho1 se crecieron en MMNO<sub>3</sub>D luego se transfirieron a YPD para el apagado de *rho1*<sup>nar</sup>. Al cabo de 4 horas se añadió CFW durante 30min y Se colectaron muestras para Western blot. **B.** Las estirpes FB1, *rho2*<sup>nar</sup> y *rho4*<sup>nar</sup> se crecieron en MMNO<sub>3</sub>D luego se transfirieron a YPD. Al cabo de 10 horas se añadió CFW durante 30min y Se colectaron muestras para Western blot. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo α-p44/42MAPK y la expresión de las variantes activas con el anticuerpo α-T7.

A diferencia de Rho1, Rho2 y Rho4 no son esenciales, lo que nos permitió realizar un ensayo de sensibilidad en placa de YPD (condiciones restrictivas). Como se muestra en la Figura 52 la estirpe carente en Rho2 no mostró mayor sensibilidad a CPZ, cafeína o a un aumento de la temperatura que la estirpe silvestre aunque si fue levemente mas sensible a CFW. En cambio la ausencia de Rho4 produce células tan sensible a estos agentes como los mutantes nulos en la cascada MAP quinasa.



**Figura 52. En ausencia de *rho4*<sup>nar</sup> las células son sensibles a los agentes que dañan la pared.** Ensayo de sensibilidad en placa. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la DO<sub>600nm</sub> inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD a 28° y 34°C y con CFW, CPZ y cafeína.

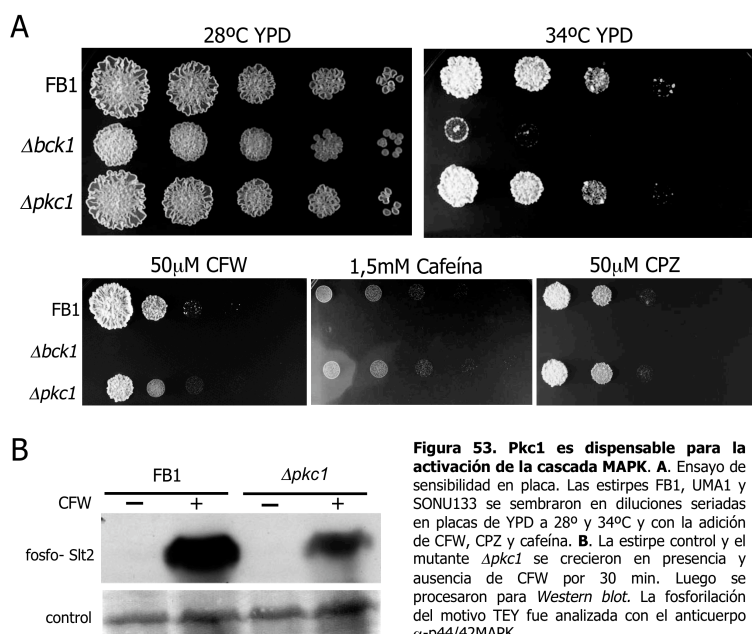
El análisis de estos resultados sugieren que Rho1 sería la principal proteína involucrado en la activación de la cascada MAP quinasa en respuesta a estrés de pared en *U. maydis*. Sin embargo, Rho4 parece tener un rol importante también. Rho2 podría tener una función complementaria o solapante en la activación de la ruta aunque no sea estrictamente necesaria.

### 3.4 UmPkc1 no es esencial para transmitir la señal de activación a UmSlt2

Continuando con la analogía a la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae*, nuestro siguiente paso fue el de estudiar en *U. maydis* un homólogo a la proteína quinasa Pkc1 y averiguar si en este organismo tenía una función similar activando la cascada MAP quinasa.

En el laboratorio teníamos de trabajos previos una estirpe carente en Pkc1 (SONU133). Esta estirpe a diferencia de *S. cerevisiae*, es viable en condiciones normales de cultivo y no es mas sensible a un aumento de la temperatura (Fig. 53 A). Sin embargo, el nivel de fosforilación de Slt2 inducido por el CFW no fue igual al observado en una estirpe silvestre en las mismas condiciones (Fig. 53 B).

Estos resultados indican que Pkc1 aunque parece estar involucrado en la transmisión de la señal, es dispensable para activar la cascada MAP quinasa en respuesta a estrés de pared.





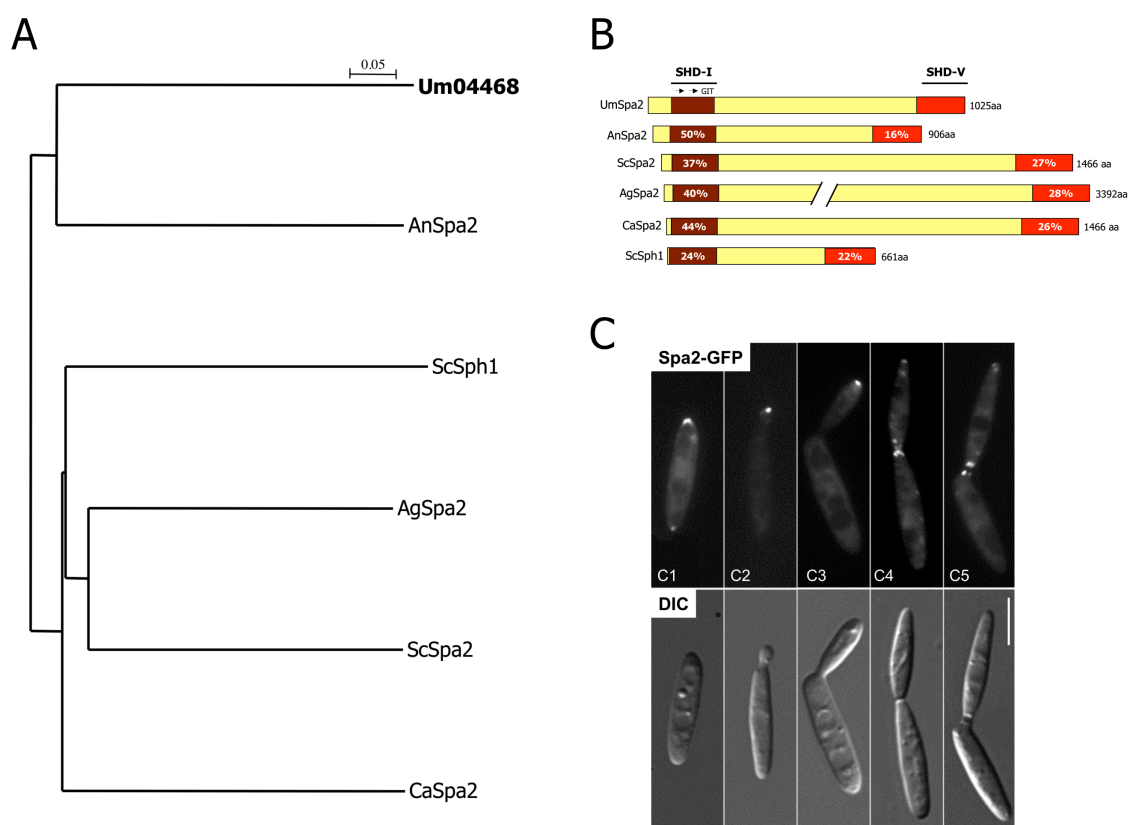
#### **4. *U. maydis* posee una proteína de la familia de Spa2**

Durante el crecimiento vegetativo en *S. cerevisiae* existe una activación de la ruta dependiente del ciclo celular que coincide con la aparición de la gema (Zarzov et al., 1996). En consonancia con esto, Slt2 se localiza en la gema durante su emergencia y desaparece en cuanto la gema comienza a crecer de manera isotrópica, coincidiendo con el final de la fase G1. Esta localización depende de la interacción con la proteína integrante del polarisoma Spa2, que a su vez también incorpora al mismo lugar a Mkk1 y Mkk2 (van Drogen and Peter, 2002)

Dado el rol otorgado a Spa2 como proteína andamio de la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae*, decidimos buscar en la secuencia de *U. maydis* una proteína similar y estudiar su función en este organismo. Comenzamos con una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con otras proteínas del tipo de Spa2 y encontramos una única pauta abierta de lectura (um04468) con una alta correspondencia de secuencia, a la que denominamos UmSpa2 o simplemente Spa2. UmSpa2 es una proteína de 1025 aminoácidos con un peso molecular 111 KDa. Estudios comparativos de las secuencias de proteínas del tipo Spa2 en *A. gossypii*, *C. albicans* y *S. cerevisiae* identificaron 3 dominios comunes, que denominaron SHD-I, SHD-II y SHD-V (Knechtle et al., 2003). Luego de comparar UmSpa2 con estas secuencias encontramos similitud solamente con los dominios SHD-I y SHD-V. El dominio SHD-I se localiza en el extremo amino terminal y contiene un tándem repetido de 30 aminoácidos, conocido como dominio GIT (Fig. 54 A, B y Fig. 66 ANEXO 2). Este dominio parece tener un papel importante en la interacción con las MAP quinasas tanto en metazoos como en *S. cerevisiae* (Roemer et al., 1998; Sheu et al., 1998; Yin et al., 2004). El dominio SHD-V se localiza en el extremo carboxilo terminal y en *S. cerevisiae* se ha descrito su interacción con la formina Bni1 (Fujiwara et al., 1998).

Dado que en otros hongos Spa2 se caracteriza por su asociación con sitios de crecimiento polarizado, nos planteamos estudiar su localización en *U. maydis*. Para lo cual, se fusionó la proteína con fluorescencia verde al extremo carboxilo terminal de Spa2. La fusión creó una proteína funcional y no se

observaron diferencias morfológicas con respecto a la estirpe silvestre (ver mas adelante la perdida de función). Como se muestra en la Figura 54 C la localización de la proteína varía en las distintas fases del ciclo celular. En células sin gema (fase G1 ó S) la señal de fluorescencia proviene de los extremos (panel C1), una vez que se forma la gema y a medida que crece (fase G2 temprana) la señal se concentra en el ápice de estas (paneles C2 y C3). Luego al final de la fase G2 y comienzo de la mitosis (panel C4) la señal permaneció en la punta de la gema pero mas dispersa. Además, en este punto apareció una clara señal proveniente del cuello de la gema. Por último, en células que estaban a punto de dividirse la señal de fluorescencia disminuyó del ápice de la gema y se observó claramente tanto en el cuello de la célula madre como en el cuello de la célula hija (panel C5).

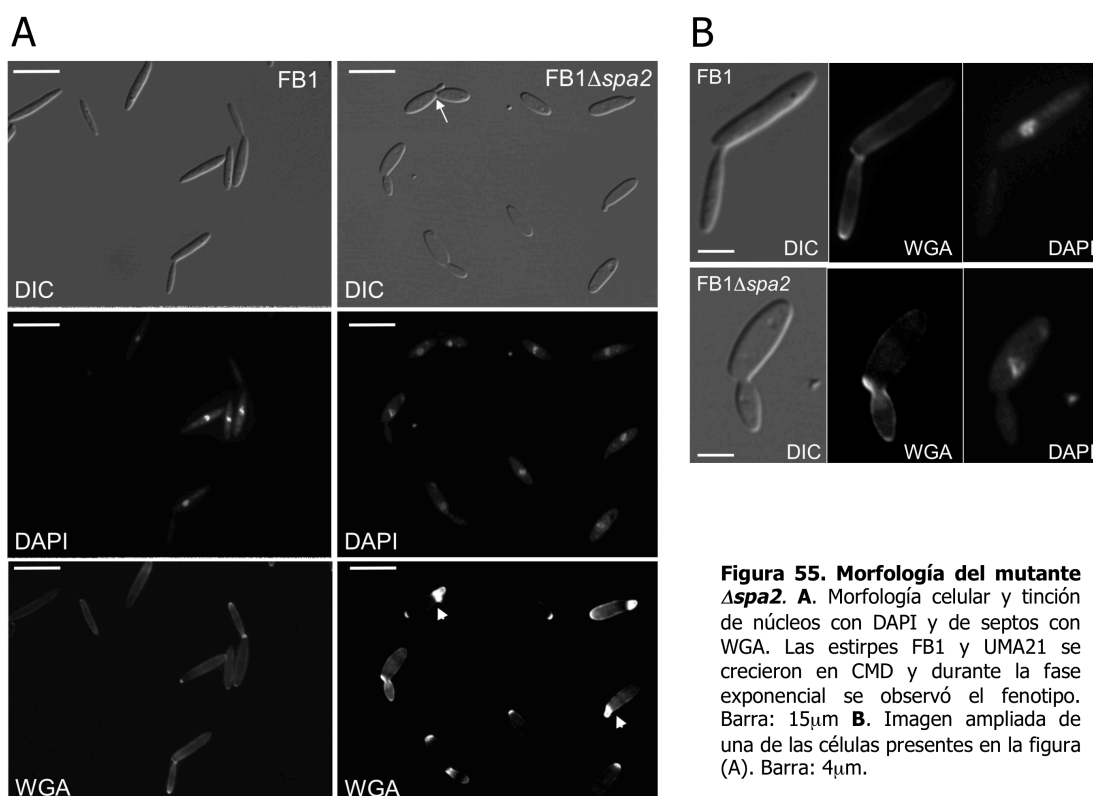


**Figura 54. *U. maydis* posee una proteína andamio tipo Spa2.** **A.** Dendrogramas de las proteínas similares a Spa2 de *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *A. gossypii*, *C. albicans* y *U. maydis* construido utilizando el método ClustalW. **B.** Esquema de las proteínas indicando los dominios SHD-I y SHD-V y los porcentajes de identidad aminoácídica de las proteínas cuando se compara con el dominio quinasa de *U. maydis*. **C.** Localización celular de UmSpa2-GFP en los sitios de crecimiento. La estirpe UMA36 se creció en CMD hasta la fase exponencial y se observó la localización de la proteína. Las fotos se montaron según la progresión del ciclo celular C1 G1/S, C2-C4 G2 y C5 mitosis. Barra: 6µm.

En resumen, la presencia de dominios conservados y la localización de UmSlt2 indican que *U. maydis* posee una proteína similar a las proteínas del tipo Spa2.

### La pérdida de función de Spa2 afecta la morfología

Continuando con la caracterización de la proteína construimos una estirpe  $\Delta spa2$  intercambiando la secuencia codificante de *spa2* por el marcador que confiere resistencia nourseotricina. La pérdida de función de Spa2 produjo células redondeadas y mas anchas que la estirpe silvestre (Fig. 55). Además, se observó un incremento de la deposición de quitina en la punta de la gema. Estas observaciones sugieren un rol de Spa2 en la polaridad celular.



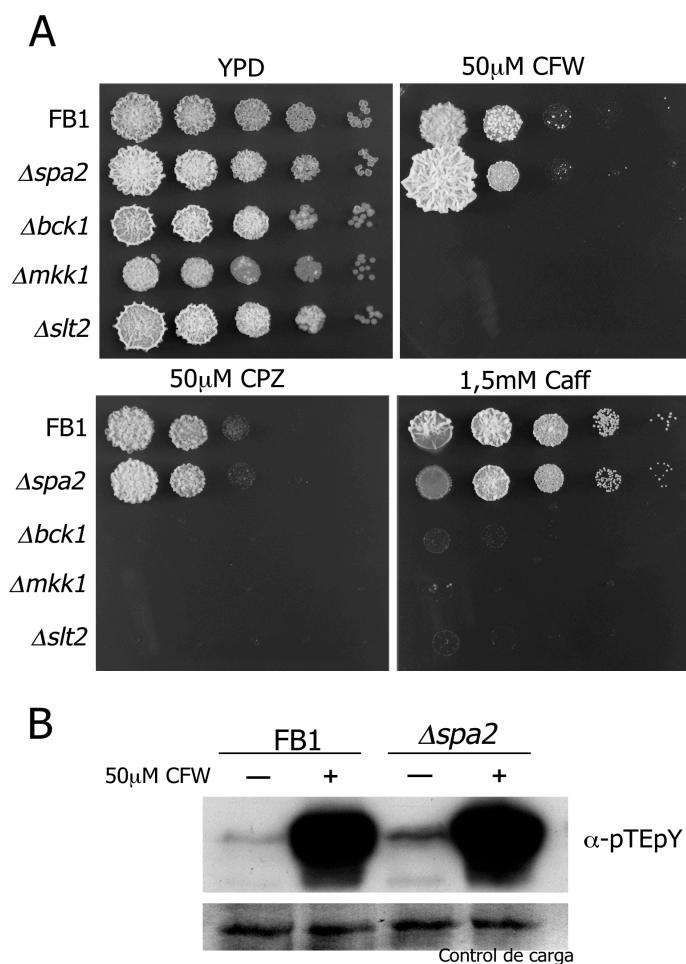
**Figura 55. Morfología del mutante  $\Delta spa2$ .** **A.** Morfología celular y tinción de núcleos con DAPI y de septos con WGA. Las estirpes FB1 y UMA21 se crecieron en CMD y durante la fase exponencial se observó el fenotipo. Barra: 15 $\mu$ m **B.** Imagen ampliada de una de las células presentes en la figura (A). Barra: 4 $\mu$ m.

### Spa2 no es necesaria para la activación de la ruta de integridad celular frente a un estrés de pared

Para estudiar la relación de Spa2 con la ruta de integridad celular analizamos la viabilidad de las células carentes de esta proteína en presencia de CFW, CPZ y Cafeína. Como muestra la Figura 56 A la estirpe  $\Delta spa2$  fue igual de resistente a la presencia de estas drogas en el medio que la estirpe silvestre.

Por otra parte, Spa2 no se necesita para la activación de Slt2 en presencia de CFW (Fig. 56 B).

Estos resultados indican que Spa2 es dispensable para la activación de la ruta de integridad celular en *U. maydis*.

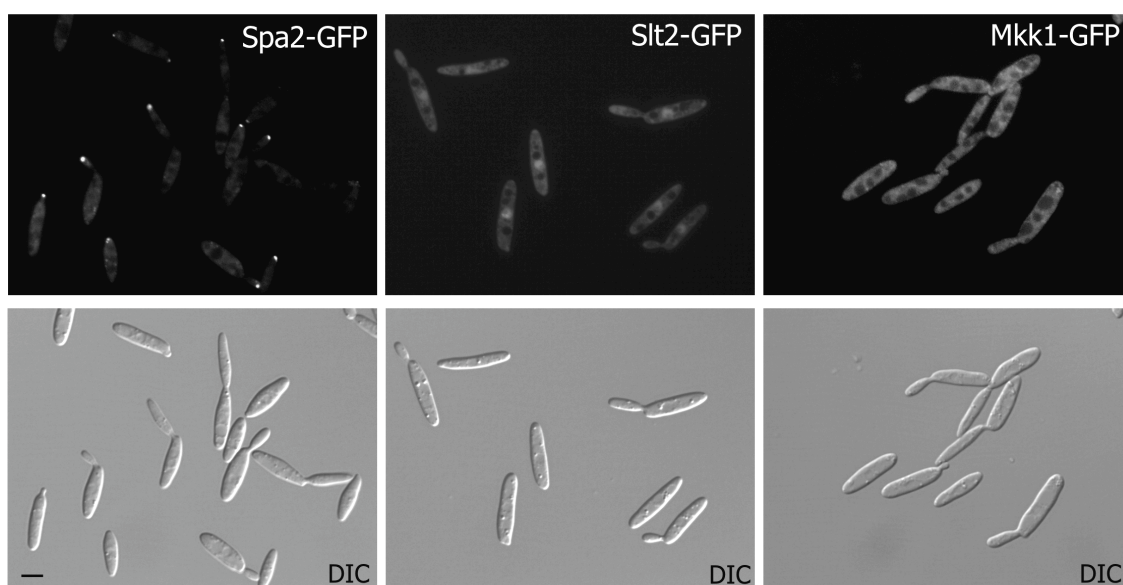


**Figura 56. Spa2 es dispensable para la activación de Slt2. A.** Ensayo de gotas. Muestras de células creciendo en YPD a 28°C en fase exponencial, fueron recolectadas, se lavaron ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 1 y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de YPD con la adición de CFW, CPZ y cafeína. **B.** La estirpe control y el mutante  $\Delta spa2$  se crecieron en presencia y ausencia de CFW por 30 min. Luego se procesaron para *Western blot*. La fosforilación del motivo TEY fue analizada con el anticuerpo  $\alpha$ -p44/42MAPK.

### A diferencia de Spa2, Mkk1 y Slt2 no se acumulan en el ápice de la gema

Como se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae* Spa2 actúa como proteína andamio de Slt2 y Mkk1 por lo cual la localización de estas proteínas coincide durante la emergencia de la gema. Para averiguar si algo similar sucedía en *U. maydis* estudiamos la localización de Slt2 y Mkk1 fusionando

ambas proteínas a la proteína con fluorescencia verde. Las estirpes portadoras de estas fusiones (Slt2-GFP, Mkk1-GFP), fueron viables no presentaron defectos morfológicos y crecieron en presencia de CFW y cafeína igual que una estirpe silvestre. Slt2-GFP presentó una distribución claramente nuclear aunque también citoplasmática independientemente de la fase del ciclo celular. La señal proveniente de Mkk1-GFP presentó una distribución citoplasmática y tampoco varió con el ciclo celular (Fig. 57).



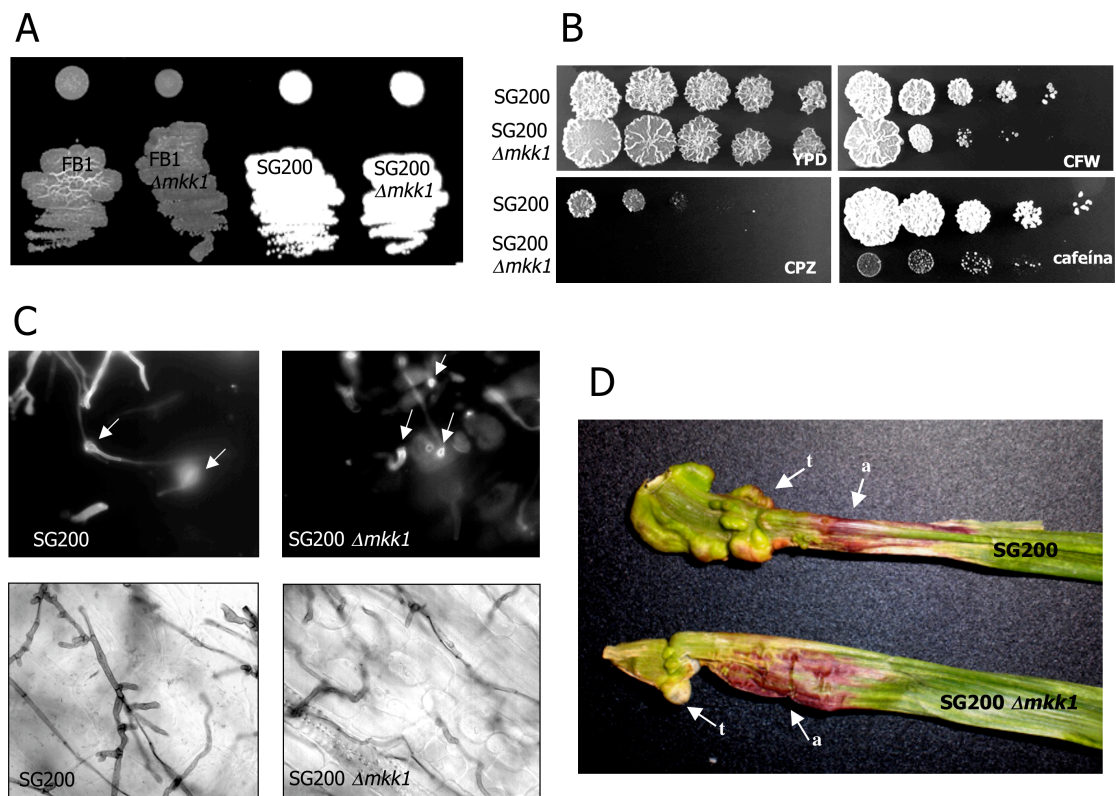
**Figura 57. Localización celular de Mkk1-GFP y Slt2-GFP.** Las estirpes Spa2-GFP, Mkk1-GFP y Slt2-GFP se crecieron en CMD hasta la fase exponencial y se observó el fenotipo. Barra: 5µm.

## **5. La ruta de integridad celular y el proceso de patogénesis en *U. maydis***

### **5.1 La cascada MAP quinasa es dispensable para la infección de la planta**

*U. maydis* en la naturaleza además de crecer como una levadura de vida libre es un hongo patógeno responsable del carbón del maíz. Por lo cual, otro aspecto importante de nuestro estudio fue el de examinar si la ausencia de actividad en la ruta de integridad celular tenía algún efecto sobre el proceso patológico.

Para esto, infectamos plantas de maíz con las estirpes SG200 y SG200 $\Delta mkk1$ . La estirpe SG200 porta la información genética necesaria para formar un filamento infectivo, sin necesidad de pasar por la formación de un tubo de conjugación previo. En este fondo genético se reemplazo la secuencia codificante *mkk1* por el gen que confiere resistencia a higromicina generando la estirpe SG200 $\Delta mkk1$ . Como se muestra en la Figura 58 A, esta estirpe tenía el mismo aspecto que la silvestre SG200 cuando se cultivaron sobre placas con PD-charcoal (medio sólido inductor de filamentos en el fondo genético SG200) y mostró mayor sensibilidad a CFW, CPZ y cafeína (Fig. 58 B).



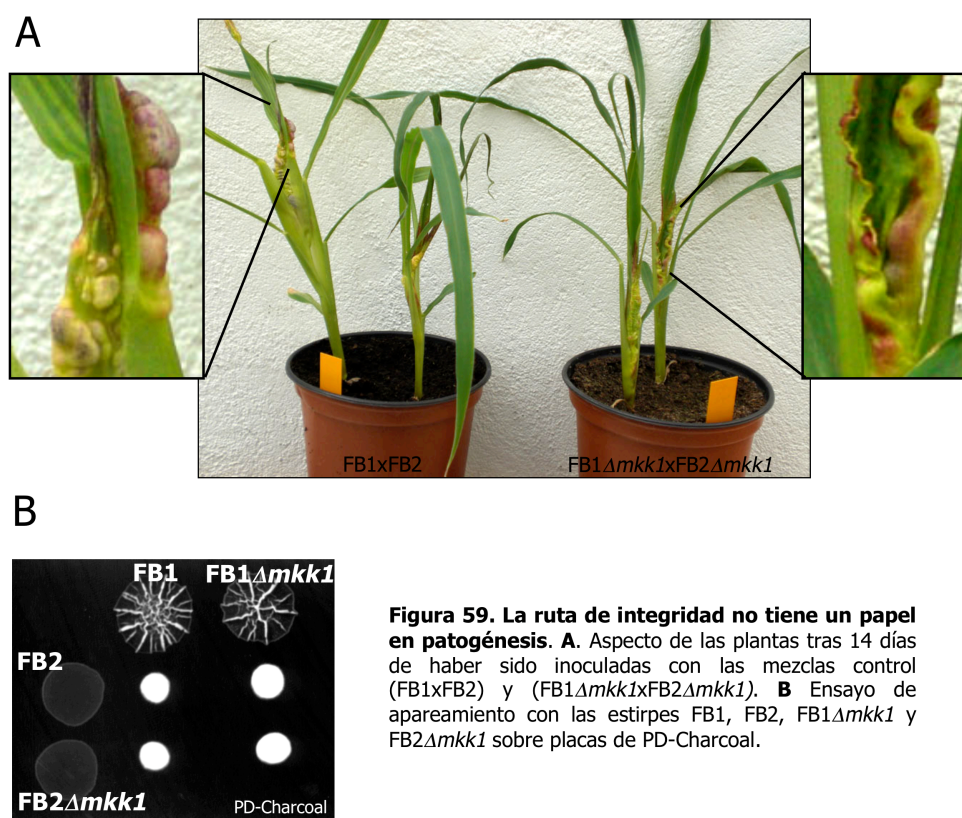
**Figura 58. La cascada MAPK es dispensable para la infección.** **A.** Las estirpes SG200 y SG200 $\Delta mkk1$  presentan un aspecto algodonoso sobre medio PD-Charcoal. **B.** Ensayo de sensibilidad en placa. Las estirpes SG200 y SG200 $\Delta mkk1$  se sembraron en diluciones seriadas en placas de YPD con la adición de CFW, CPZ y cafeína. **C.** Panel superior: Apresorios de las estirpes SG200 y SG200 $\Delta mkk1$  teñidos con calcoflúor en la superficie de la planta 16 horas después de la infección. Panel inferior: Micelio del hongo dentro de la planta teñido con Clhorazol Black. **D.** Aspecto de hojas de maíz obtenidas de plantas 20 días después de ser infectadas. a: mancha de antocianina, t: tumores

Por otra parte, sabemos que mutantes en la ruta de integridad están asociados con defectos en la virulencia en otros hongos patógenos. Los



defectos van desde muy severos, como en *Magnaporthe grisea* (Xu *et al.*, 1998) donde la ausencia de la MAP quinasa Mps1 no permite que se forme el apresorio (estructura especializada para la penetración del huésped) hasta una disminución de la virulencia como en *Candida albicans* (Diez-Orejas *et al.*, 1997). En cambio, en *U. maydis* la estirpe SG200 $\Delta mkk1$  fue capaz de formar apresorios y penetrar la planta al igual que la estirpe salvaje, produciendo los síntomas característicos de la enfermedad, clorosis, antocianina y tumores (Fig. 58 C y D).

Confirmamos estos resultados tras repetir la infección de las plantas de maíz con una mezcla de estirpes sexualmente compatibles pero deficientes en *mkk1*. Previamente verificamos que las estirpes FB1  $\Delta mkk1$  y FB2  $\Delta mkk1$  fueran capaces de aparearse sobre placas de PD-charcoal al igual que las estirpes silvestres FB1 y FB2 (Fig. 59 B). Se inocularon 60 plantas, 30 con la mezcla de estirpes silvestres y 30 con la mezcla de estirpes compatibles carentes en Mkk1. Al cabo de 15 días pos inoculación casi el 100% de las plantas infectadas con ambas mezclas desarrollaron tumores (Fig. 59 A).



**Figura 59. La ruta de integridad no tiene un papel en patogénesis. A.** Aspecto de las plantas tras 14 días de haber sido inoculadas con las mezclas control (FB1x FB2) y (FB1 $\Delta mkk1$ x FB2 $\Delta mkk1$ ). **B** Ensayo de apareamiento con las estirpes FB1, FB2, FB1 $\Delta mkk1$  y FB2 $\Delta mkk1$  sobre placas de PD-Charcoal.





## Discusión

---



En este trabajo hemos identificado una segunda ruta de señalización MAPK en *U. maydis*. Hemos caracterizado los componentes genéticos de la cascada, analizado los mutantes nulos y de ganancia de función y por último estudiado su relación con el proceso infectivo de este hongo.

### **Ruta de integridad celular en *U. maydis***

Mediante la comparación de secuencias *in silico* identificamos tres proteínas quinasas Bck1, Mkk1 y Slt2 en *U. maydis* que forman parte de una vía de transmisión de señal homóloga a la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae* y en *S. pombe*. La supresión individual de estos genes produce estirpes con fenotipos idénticos. En condiciones habituales (YPD, 28°C), crecen con normalidad al igual que una estirpe silvestre, pero resultan inviables cuando la temperatura se eleva a 34°C o en presencia de CFW, CPZ y cafeína, fenotipo que se puede remediar completamente con la adición de sorbitol al medio en el caso de un aumento de la temperatura y parcialmente para CFW, CPZ y cafeína. Estos datos sugieren la participación de estas quinasas en el control de la integridad de la pared celular.

El RC y el CFW interfieren en la biosíntesis de dos de los principales polisacáridos estructurales de la pared, el glucano y la quitina. Por lo general, en los organismos donde se ha estudiado mutantes nulos en la ruta de integridad celular muestran un aumento de la sensibilidad a ambos agentes. Curiosamente, los mutantes nulos en *U. maydis* fueron igual de sensibles al RC que una estirpe silvestre. No tenemos una explicación obvia para este resultado aunque, una posibilidad podría ser que la señal de estrés producida por el RC se transmita a las células por la ruta de integridad celular y por otra vía de señalización independiente. De esta manera, a pesar de que el RC pueda inducir la activación de ambas rutas, la pérdida de función en una de las vías no es esencial para la supervivencia. Aunque en este trabajo no hemos confirmado que Slt2 se fosforile en presencia de RC, sospechamos que esto puede ser posible.

Otro aspecto que podría explicar en parte las diferencias en la sensibilidad al RC y al CFW es el contenido de  $\beta$ -glucanos y quitina de la pared. Se ha

descrito que el CFW interfiere con las cadenas nacientes de quitina impidiendo el ensamblaje de nuevas cadenas a la pared, en cambio el RC se ha relacionado con la inhibición del ensamblaje de las unidades de  $\beta$ -1,3 glucano. En *S. cerevisiae* mutantes con un incremento del contenido de quitina de la pared celular son mas sensibles a CFW mientras que mutantes con un contenido reducido son mas resistentes (Nikolaou et al., 2009). De estas observaciones, se desprende la idea de que el contenido de quitina de la pared celular en *U. maydis* sea elevado y de ahí que el efecto causado por este agente sea mas marcado.

Por otra parte, la ruta de integridad esta involucrada con la respuesta celular frente a diversos estreses ambientales. Por lo cual nos preguntamos si los mutantes nulos eran mas sensibles al estrés osmótico y oxidativo que la estirpe silvestre. Para estudiar el estrés osmótico realizamos los ensayos de sensibilidad en placa añadiendo KCl,  $\text{CaCl}_2$ , NaCl (esta placa no se muestra en los resultados) y sorbitol. Escogimos KCl,  $\text{CaCl}_2$  y NaCl porque en *S. pombe* la ruta Pmk1-MAPK además de su papel en el mantenimiento de la integridad celular, se la vincula con la homeostasis de iones y la perdida de función en elementos de la cascada resultan en una hipersensibilidad al KCl,  $\text{CaCl}_2$  y un incremento de la tolerancia al NaCl (Madrid et al., 2006; Sengar et al., 1997; Toda et al., 1996). En ningún caso los mutantes de *U. maydis* mostraron diferencias con respecto a la estirpe silvestre. También ensayamos el efecto del peróxido de hidrógeno pero tampoco en este caso los mutantes nulos fueron mas sensibles. Lo que indica que la cascada Slt2-MAPK en *U. maydis* no tiene un papel importante en la respuesta al estrés osmótico u oxidativo aunque no se pueda descartar, una activación de Slt2 en presencia de estos estímulos, tal como sucede en *S. pombe* donde Pmk1 se fosforila en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin embargo un mutante  $\Delta pmk1$  no es mas sensible que la estirpe silvestre en un ensayo en placa (Madrid et al., 2006). En *S. cerevisiae* el estrés oxidativo producido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la activación de la ruta de integridad sin embargo el módulo MAP quinasa aguas abajo de Pkc1 no es necesario para la viabilidad celular frente a este estrés (Vilella et al., 2005).

En este trabajo aportamos evidencias genéticas y bioquímicas que apoyan un modelo donde Bck1, Mkk1 y Slt2 son componentes de una misma cascada MAPK. Los dobles y triple mutante no exhibieron un fenotipo exagerado ni distinto a los mutantes individuales. Además, como se ha visto en *S. cerevisiae*, Slt2 en *U. maydis* se fosforila en los residuos de Thr<sup>193</sup> y Tyr<sup>195</sup> en respuesta a un estrés de pared y esta fosforilación es dependiente de Bck1 y Mkk1. Por otra parte, demostramos que la fosforilación de Slt2 se correlaciona con un incremento de su actividad quinasa necesaria para inducir tolerancia al CFW. En conjunto estos datos indican que Bck1, Mkk1 y Slt2 forman parte de una nueva cascada de señalización MAPK en *U. maydis*, la ruta de integridad celular

### **Modulo superior**

En una primera aproximación para descifrar los componentes aguas arriba del modulo central MAPK, utilizamos versiones constitutivamente activas de las proteínas Rhos de *U. maydis*. La expresión de estos mutantes reveló que tanto Rho1, Rho2 y Rho4 son capaces de activar la cascada e inducir la fosforilación de Slt2. Luego con el análisis de las estirpes condicionales, Rho1 resultó ser el mejor candidato debido a que el apagado del gen elimina totalmente la fosforilación de Slt2 inducida por la presencia de CFW en el medio. En cambio, la ausencia de Rho2 no presenta variaciones en los niveles de fosforilación de Slt2, lo que sugiere una función complementaria o solapante en la activación de la ruta aunque no sea estrictamente necesaria. Algo similar sucede en *S. cerevisiae* donde Rho2 no es esencial y su actividad es parcialmente redundante con Rho1 (Levin, 2005).

Por otra parte, el apagado de Rho4 disminuye el nivel de fosforilación de Slt2 y además las células presentan el mismo fenotipo que un mutante nulo en la cascada ( $\Delta bck1$ ,  $\Delta mkk1$  o  $\Delta slt2$ ) en su ausencia. Lo que sugiere un rol importante de esta proteína G en la activación de la ruta de integridad en *U. maydis*. Evidencias que relacionan Rho4 con la ruta de integridad celular provienen de *S. pombe*, donde Santos et al., (2003) observaron que tanto la perdida de función como la sobreexpresión resultan en un defecto en la pared

celular. Los autores proponen un papel para Rho4 regulando la degradación del septo durante la citocinesis (Santos et al., 2003; Santos et al., 2005).

Otro componente fundamental de este módulo es la proteína Pkc1. *U. maydis* al igual que *S. cerevisiae* posee una sola proteína de la familia PKC. Sin embargo, a diferencia de esta, una estirpe  $\Delta pkc1$  no es más sensible a un aumento de la temperatura ni a la presencia de CFW, CPZ y cafeína en el medio. Además, el CFW sigue induciendo la fosforilación de Slt2 en esta estirpe a pesar de que el nivel de fosforilación sea menor que el observado en una estirpe silvestre en las mismas condiciones. Todo indica que en *U. maydis* Pkc1 es dispensable para la activación de la cascada MAP quinasa en respuesta a estrés de pared. Curiosamente la estirpe  $\Delta pkc1$  si es más sensible al RC (Castillo-Lluva comunicación personal) lo cual refuerza la idea de que la señal de RC y CFW entren a la célula por vías de señalización diferentes que pueden cruzarse en algún punto.

Como se mencionó al comienzo de esta sección, estos experimentos son tan solo los primeros pasos en nuestro intento de elucidar los componentes encargados de transmitir la señal de estrés generada en la superficie al módulo MAP quinasa. Por el momento Rho1 es nuestro mejor candidato como proteína activadora de la cascada y Pkc1 parece no ser esencial para la transmisión de esta señal.

### **Los factores de transcripción Rlm1 y SBF**

Así como un estrés de pared activa la ruta con la consecuente fosforilación de Slt2, también ocurre lo mismo con la expresión de un versión constitutivamente activa de Mkk1. En este caso al igual que sucede en *S. cerevisiae* la sobreexpresión del alelo  $mkk1^{DD}$  es tóxico para las células. Y a diferencia de esta, la supresión del factor de transcripción Rlm1 no es capaz de revertir la inhibición del crecimiento provocada por el alelo  $mkk1^{DD}$ . Por otra parte, a pesar de que los efectos en el fenotipo de una estirpe  $\Delta rlm1$  en *S. cerevisiae* sean menos marcados que en un mutante  $\Delta slt2$ , las células carentes en *rlm1* siguen presentando sensibilidad a cafeína. Algo similar sucede en *Aspergillus niger* y *Aspergillus nidulans* donde RlmA (homólogo a Rlm1) esta

involucrado en la inducción de  $\alpha$ -1,3 glucano sintasa en respuesta a estrés de pared y en estos hongos filamentoso un mutante  $\Delta rlm1A$  es sensible a CFW (Damveld et al., 2005; Fujioka et al., 2007). En *U. maydis* el mutante  $\Delta rlm1$  no tiene un fenotipo similar al que presentan mutantes nulos en la cascada. No es termosensible, es resistente a cafeína, CFW y CPZ y además no revierte el efecto tóxico causado por el alelo  $mkk1^{DD}$  lo que sugiere que Rlm1 podría no ser una diana de la ruta de integridad celular.

La otra proteína descrita como diana de la ruta de integridad es el complejo Swi4/Swi6. Identificamos dos proteína similares a esta familia de factores de transcripción a los que denominamos Rcl1 y Rcl2. La estirpe  $\Delta rcl1$  fue levemente mas sensible a CFW y cafeína pero no fue capaz de revertir el efecto tóxico causado por el alelo  $mkk1^{DD}$ . En nuestro análisis hemos considerado que en *U. maydis* el heterodímero Rcl2/Rcl1 cumplía una función similar al complejo SBF en *S. cerevisiae* así, la delección de una de las proteínas bloquearía la actividad del complejo. Sin embargo, Rcl1 y Rcl2 son proteínas muy parecidas entre si, tienen ambas un dominio de interacción a ADN y proteína-proteína, lo que sugiere que pudieran actuar también como homodímeros (Rcl1/Rcl1 o Rcl2/Rcl2) y de esta forma explicar porque el mutante  $\Delta rcl2$  no es mas sensible a CFW ni a cafeína. Tomando en cuenta esta posibilidad, sería interesante repetir estos ensayos utilizando una estirpe doble mutante ( $\Delta rcl1, \Delta rcl2$ ).

### **La proteína andamio Spa2**

Durante el desarrollo de esta tesis hemos caracterizado la proteína Spa2 (Carbo y Perez-Martin, 2008). El análisis de los mutantes nulos y el estudio de la localización indican un rol como proteína andamio durante el proceso de polarización. Sin embargo, una estirpe  $\Delta spa2$  no presenta el mismo espectro de sensibilidad que los mutantes nulos en la cascada MAPK, tampoco su ausencia interfiere con los niveles de fosforilación de Slt2 en respuesta a CFW, lo que sugiere que no tiene un papel en la activación de la ruta de integridad. Además como ni Mkk1 ni Slt2 parecen acumularse en el ápice de la gema durante el

crecimiento normal o durante estrés, no pudimos verificar su posible relación con estas proteínas durante la aparición de la gema.

### **La activación de la ruta de integridad celular evita el crecimiento polar**

La activación de Slt2 inducida por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>* afecta el crecimiento celular. Del análisis del fenotipo de las células destacan principalmente dos aspectos. Primero la ausencia de gemas con la formación de agregados celulares, en donde las células se dividen por septos, son cada vez más pequeñas y se mantienen unidas. Este fenotipo lo hemos relacionado con un acortamiento de la fase G2 provocado por una entrada rápida en mitosis. Esta observación se apoya en la disminución de la fosforilación de la Cdk1 en la Tyr<sup>15</sup> inducida por el alelo hiperactivo *mkk1<sup>DD</sup>*. En segundo lugar se observa un crecimiento isotrópico particularmente en los extremos. Para este efecto, no hemos hallado una explicación por el momento. Una posibilidad de entender este fenómeno podría provenir de la activación de Rac1. En *U. maydis* se ha propuesto a la GTPasa Rac1 junto con su efector Cla4 (una quinasa de la familia PAK) como reguladores del crecimiento polarizado durante el proceso de gemación y filamentación. Así, un alelo constitutivamente activo *rac1<sup>QL</sup>* resulta en la activación deslocalizada de Cla4, lo que produce una expansión isotrópica de la pared (Mahlert *et al.*, 2006). Otra posibilidad sería simplemente pensar que lo que está sucediendo es consecuencia de la inhibición del crecimiento polar y no debido a un mecanismo específico que induzca crecimiento isotrópico.

Todo indica que la hiperactivación de Slt2 en *U. maydis* produce inhibición del crecimiento polar acompañado de un adelanto de la transición G2/M. En este punto a nuestro entender es donde radica la principal diferencia con lo que se ha observado para *S. cerevisiae*. Mientras que en esta levadura la activación de la ruta de integridad celular en ciertos casos promueve una parada en fase G2, en *U. maydis* en cambio la activación favorece el acortamiento de G2.

Una paradoja como esta se aplica también a la respuesta a feromona. En *S. cerevisiae* se produce una parada en G1 en respuesta a feromona y por el

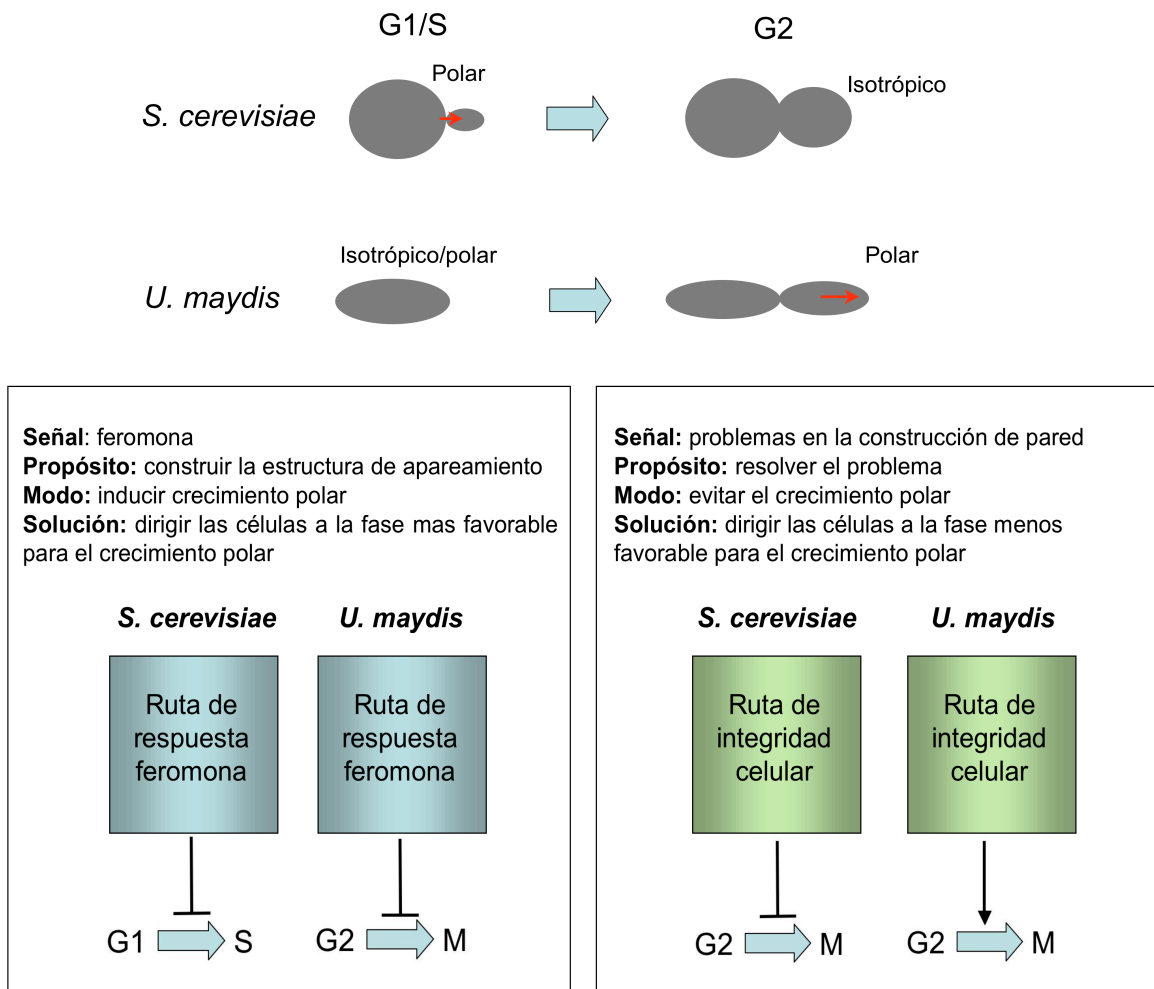


contrario en *U. maydis* se detiene el ciclo en G2 (Garcia-Muse et al., 2004; Sprague, 1992). Porque entonces, dos rutas similares que responden al mismo estímulo (feromona), con prácticamente los mismos componentes y que persiguen los mismos fines (apareamiento) presentan efectos sobre el ciclo celular tan diferentes. Nosotros pensamos que una explicación mecánica podría dar un sentido biológico a esta paradoja. Durante la respuesta a feromona se induce un crecimiento polarizado destinado a la formación de la estructura de apareamiento. Por lo cual la fase del ciclo celular en donde el crecimiento polar sea favorecido será la mas adecuada para mantener la parada. Así en *S. cerevisiae* que crece polarmente durante la formación de la gema (fase G1/S), se favorecerá una parada del ciclo en G1 para la formación del *shmoo*. Por el contrario, en *U. maydis* el crecimiento polarizado se da principalmente durante la fase G2, es en esta fase donde se produce la formación de la gema con la consecuente reorganización del citoesqueleto que permitirá mantener un crecimiento apical durante la formación del tubo de conjugación.

Siguiendo un razonamiento similar, podemos pensar que daños en la pared celular o problemas asociados con la remodelación de la misma durante el ciclo celular serán detectados por la ruta de integridad celular y por sistemas de vigilancia (*checkpoints*) que pondrán en marcha una serie de medidas para resolver el problema. Dado que el crecimiento polarizado genera estrés en la pared celular, un retardo en el proceso de expansión puntual de la superficie en respuesta a un daño, supone para las células una reducción del estrés en la pared respecto a las que mantienen un crecimiento polarizado. Por lo tanto, una de estas medidas de salvaguarda podría ser la de evitar el crecimiento polarizado. Así en *S. cerevisiae* se evitaría la fase G1/S promoviéndose la detención en G2 y por el contrario en *U. maydis* se intentaría salir de la fase G2 promoviendo la entrada en mitosis (Fig. 60)

Como resumen de este trabajo quisiera resaltar la idea de que rutas de señalización MAPK conservadas a nivel de sus componentes, su organización, conexiones y activación, en dos organismos con un estilo de vida diferente

pueden no generar las mismas respuestas (*output*) frente a un mismo estímulo (*input*). Esto responderá a la historia evolutiva de los organismos.



**Figura 60.** La salida de la cascada dependerá del estilo de vida de cada organismo.

### Ruta de integridad celular y patogénesis

Otro aspecto importante de nuestro estudio fue examinar la relación que existe entre la ruta de integridad celular y la virulencia en *U. maydis*. Mediante la infección de plantas de maíz con estirpes carentes en Mkk1, llegamos a la conclusión que la pérdida de función en la ruta de integridad no tiene efecto sobre el proceso patogénico. Las estirpes mutantes forman apresorios, penetran la planta y producen tumores al igual que una estirpe silvestre.

En el hongo fitopatógeno *M. grisea*, la ruta de integridad celular esta asociada a virulencia porque la carencia de Mps1 (MAPK-Slt2) impide la

formación del apresorio (Xu et al., 1998). El apresorio particularmente grande en este hongo, es una estructura ensanchada separada del tubo germinal por un septo que se adhiere a la superficie y genera una enorme fuerza física de presión que destruye la cutícula permitiendo el acceso al interior de la planta (Talbot, 2003). Esta presión a la que está sometido el apresorio requiere una remodelación de la estructura de la pared. De lo que se desprende el papel fundamental que cumple la ruta de integridad en el proceso de patogénesis en este organismo. En cambio, en *U. maydis* el apresorio es una estructura más modesta que consiste en un engrosamiento del extremo de la hifa infectiva que, en lugar de ejercer una fuerza física para la penetración, se piensa que localiza el lugar para la secreción de enzimas

*C. albicans* es un modelo de patógeno animal donde también se ha puesto de manifiesto la importancia de las rutas MAP quinasas en la patogenicidad (Roman et al., 2007). En este hongo la pérdida de función de Mkc1 (MAPK-Slt2) produce una reducción de la virulencia respecto a una estirpe silvestre y esta diferencia en la capacidad infectiva surge poco después de la inoculación de los ratones. Lo que indica que estos mutantes presentan problemas a la hora de enfrentarse a la barrera fagocítica (Diez-Orejas, 1997). Así, la reducción de la patogenicidad por la pérdida de función en la ruta de integridad, se ha relacionado con cambios en la glucosilación de las proteínas de la pared celular reconocidas por el sistema inmunitario y con una disminución de la resistencia al estrés oxidativo o de otro tipo, al que el patógeno ha de afrontar tras la fagocitosis. En este caso defectos en la integridad de la pared presentan problemas a la hora de superar las defensas del huésped. Por su parte, *U. maydis* parece establecer una relación biotrófica con el huésped, lo que implica una adaptación altamente especializada del patógeno a la planta. Estudios recientes, proponen que *U. maydis* dispara una defensa discreta de la planta y es capaz de reprogramar las células vegetales interfiriendo en la diferenciación de los tejidos (Doehlemann et al., 2008). Por lo tanto, podemos suponer que en este hongo defectos en la integridad de la pared celular no representarían grandes problemas como en el modelo animal.

Por otra parte, en *Aspergillus fumigatus* la MAP quinasa MpKA (homólogo de Slt2) esta involucrada en la regulación de la integridad de la pared celular y en la respuesta a estrés oxidativo. Sin embargo, un mutante  $\Delta mpkA$  es igual de virulento que la estirpe silvestre en un modelo de infección sistémica en ratón (Valiante et al., 2008).

En resumen consideramos que a lo mejor hemos dado demasiada importancia al papel que podría jugar la ruta de integridad celular en el proceso patogénico en *U. maydis*. Al parecer la ausencia de función en esta ruta no tiene grandes consecuencias para las células en condiciones normales. Aunque, se vuelve relevante para la supervivencia en condiciones de estrés de pared.

## Conclusiones

---



## CONCLUSIONES

1. Las proteínas Bck1 (MAPKKK), Mkk1 (MAPKK) y Slt2 (MAPK) en *U. maydis* constituyen una sola vía de señalización MAP quinasa: la ruta de integridad celular.
2. Slt2 se fosforila en el dominio TEY en respuesta al estrés producido por agentes que dañan la pared.
3. La fosforilación y la actividad quinasa de Slt2 son necesarias para la viabilidad celular en presencia de CFW.
4. La hiperactivación de la cascada MAP quinasa es tóxica para las células.
5. La ausencia de Rlm1 o Rcl1 no revierten el efecto tóxico inducido por el alelo *mkk1<sup>DD</sup>*.
6. La activación constitutiva de Slt2 promueve el paso G2/M actuando directa o indirectamente sobre Cdc25.
7. Rho1 sería la principal GTPasa involucrada en la activación de la cascada MAP quinasa en respuesta a estrés de pared.
8. La proteína Spa2 no parece tener una función de andamio para las proteínas Mkk1 y Slt2.
9. La ruta de integridad celular no tiene un papel en patogénesis.









- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H. and Treisman, R.** (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem* **273**, 8616-22.
- Alfa, C. F., P. Hyams, J. McLead, M. and Warbrick, E.** (1993). Experiments with Fission Yeast: A laboratory course manual.
- Andrews, P. D. and Stark, M. J.** (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* **113 ( Pt 15)**, 2685-93.
- Ausubel, F. B., R. Kingston, R. Moore, D. Seidman, J. Smith, J. and Struhl, K.** (1997). Current Protocols in Molecular Biology. Nwe York.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M. and Andrews, B.** (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**, 6515-28.
- Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. and Cardenas, M. E.** (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**, 57-69.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F. and Herskowitz, I.** (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-5882.
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Nunez, A., Vicente, J., Gacto, M. and Cansado, J.** (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* **20**, 748-57.
- Bauer, R., Oberwinkler, F. Vanky, K.** (1997). Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Bot.* **75**, 1273-1314.
- Bolker, J. A.** (1995). Model systems in developmental biology. *Bioessays* **17**, 451-5.
- Bolker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-401.
- Bonilla, M. and Cunningham, K. W.** (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 4296-305.
- Bottin, A., Kamper, J. and Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-52.
- Brachmann, A., Konig, J., Julius, C. and Feldbrugge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-26.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-63.
- Breeden, L. L.** (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr Biol* **13**, R31-8.
- Buehrer, B. M. and Errede, B.** (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 6517-25.

- Cabib, E., Drgonova, J. and Drgon, T.** (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67**, 307-33.
- Cairns, B. R., Ramer, S. W. and Kornberg, R. D.** (1992). Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes Dev* **6**, 1305-18.
- Carbo, N. and Perez-Martin, J.** (2008). Spa2 is required for morphogenesis but it is dispensable for pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1315-27.
- Castillo-Lluva, S., Garcia-Muse, T. and Perez-Martin, J.** (2004). A member of the Fizzy-related family of APC activators is regulated by cAMP and is required at different stages of plant infection by *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **117**, 4143-56.
- Castillo-Lluva, S. and Perez-Martin, J.** (2005). The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. *Plant Cell* **17**, 3544-60.
- Chang, L. and Karin, M.** (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chen, R. E. and Thorner, J.** (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311-40.
- Clotet, J. and Posas, F.** (2007). Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* **428**, 63-76.
- Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J.** (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-6.
- Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M. and Carr, A. M.** (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**, 59-68.
- Damveld, R. A., Arentshorst, M., Franken, A., van Kuyk, P. A., Klis, F. M., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F.** (2005). The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. *Mol Microbiol* **58**, 305-19.
- Dard, N. and Peter, M.** (2006). Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays* **28**, 146-56.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. and Klis, F. M.** (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146** ( Pt 9), 2121-32.
- Delley, P. A. and Hall, M. N.** (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**, 163-74.
- Denis, V. and Cyert, M. S.** (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* **4**, 36-45.

- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F. I., Meglecz, E. and Roncero, M. I.** (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol* **39**, 1140-52.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-Garcia, F., Pla, J., Nombela, C. and Sanchez-Perez, M.** (1997). Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect Immun* **65**, 833-7.
- Dodou, E. and Treisman, R.** (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**, 1848-59.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. et al.** (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-95.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y. and Cabib, E.** (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**, 277-9.
- Dunaway, S., Liu, H. Y. and Walworth, N. C.** (2005). Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci* **118**, 39-50.
- Errede, B., Gartner, A., Zhou, Z., Nasmyth, K. and Ammerer, G.** (1993). MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 in vitro. *Nature* **362**, 261-4.
- Flandez, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martin, H. and Molina, M.** (2004). Reciprocal regulation between Slit2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**, 11027-34.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T. and Abe, K.** (2007). MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **6**, 1497-510.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. and Takai, Y.** (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1221-33.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. and Perez-Martin, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Gartner, A., Nasmyth, K. and Ammerer, G.** (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev* **6**, 1280-92.
- Gulli, M. P. and Peter, M.** (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev* **15**, 365-79.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.

**Harrison, J. C., Bardes, E. S., Ohya, Y. and Lew, D. J.** (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* **3**, 417-20.

**Hoffman, C. S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.

**Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. New York: Plenum Press.

**Igual, J. C., Johnson, A. L. and Johnston, L. H.** (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J* **15**, 5001-13.

**Jimenez-Sanchez, M., Cid, V. J. and Molina, M.** (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Sit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**, 31174-85.

**Jung, U. S. and Levin, D. E.** (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**, 1049-57.

**Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J. and Levin, D. E.** (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**, 781-9.

**Kaiser, C. M., S. Mitchaell, A.** (1994). *Methods in Yeast Genetics*. New York.

**Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J. and Levin, D. E.** (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* **9**, 1559-71.

**Kamper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-10.

**Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Muller, O. et al.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.

**Kim, K. Y., Truman, A. W. and Levin, D. E.** (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* **28**, 2579-89.

**Klosterman, S. J., Perlin, M. H., Garcia-Pedrajas, M., Covert, S. F. and Gold, S. E.** (2007). Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Adv Genet* **57**, 1-47.

**Knechtle, P., Dietrich, F. and Philippsen, P.** (2003). Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Biol Cell* **14**, 4140-54.

**Kruger, J., Aichinger, C., Kahmann, R. and Bolker, M.** (1997). A MADS-box homologue in *Ustilago maydis* regulates the expression of pheromone-inducible genes but is nonessential. *Genetics* **147**, 1643-52.

**Kultz, D.** (1998). Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* **46**, 571-88.

- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G. and Francois, J.** (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-66.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 746-85.
- Levin, D. E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 262-91.
- Locke, E. G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y. and Cunningham, K. W.** (2000). A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol Cell Biol* **20**, 6686-94.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B. and Snyder, M.** (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**, 1781-4.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Perez, P., Gacto, M. and Cansado, J.** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**, 2033-43.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bolker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-78.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. and Molina, M.** (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511-9.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D. and Gold, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Mayorga, M. E. and Gold, S. E.** (1999). A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol* **34**, 485-97.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. and Mann, C.** (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **123**, 1821-33.
- Mehrabi, R., Ding, S. and Xu, J. R.** (2008). MADS-box transcription factor *mig1* is required for infectious growth in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot Cell* **7**, 791-9.
- Mey, G., Held, K., Scheffer, J., Tenberge, K. B. and Tudzynski, P.** (2002). CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Mol Microbiol* **46**, 305-18.

- Mielnichuk, N. and Perez-Martin, J.** (2008). 14-3-3 regulates the G2/M transition in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1206-15.
- Moffat, J. and Andrews, B.** (2004). Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat Cell Biol* **6**, 59-66.
- Monge, R. A., Roman, E., Nombela, C. and Pla, J.** (2006). The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 905-12.
- Muller, P., Aichinger, C., Feldbrugge, M. and Kahmann, R.** (1999). The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-17.
- Muller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. and Kahmann, R.** (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-99.
- Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Pla, J. and Nombela, C.** (1995). Functional characterization of the MKC1 gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol Cell Biol* **15**, 2197-206.
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I. and Brown, A. J.** (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* **9**, 44.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H.** (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-83.
- Perez-Martin, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J. and Carbo, N.** (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics* **276**, 211-29.
- Posada, J. and Cooper, J. A.** (1992). Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**, 212-5.
- Qi, M. and Elion, E. A.** (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**, 3569-72.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bolker, M. and Kahmann, R.** (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *Embo J* **16**, 1934-42.
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H.** (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-6.
- Roemer, T., Vallier, L., Sheu, Y. J. and Snyder, M.** (1998). The Spa2-related protein, Sph1p, is important for polarized growth in yeast. *J Cell Sci* **111** ( Pt 4), 479-94.
- Roman, E., Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. and Pla, J.** (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* **15**, 181-90.



- Sambrook, J. F., E. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual.
- Santos, B., Gutierrez, J., Calonge, T. M. and Perez, P.** (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 521-33.
- Santos, B., Martin-Cuadrado, A. B., Vazquez de Aldana, C. R., del Rey, F. and Perez, P.** (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell* **4**, 1639-45.
- Schmidt, A., Schmelzle, T. and Hall, M. N.** (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **45**, 1433-41.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J. and Young, D.** (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **17**, 3508-19.
- Sgarlata, C. and Perez-Martin, J.** (2005a). The *cdc25* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **58**, 1482-96.
- Sgarlata, C. and Perez-Martin, J.** (2005b). Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **118**, 3607-22.
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. and Snyder, M.** (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* **18**, 4053-69.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. and Russell, P.** (1998). Heat stress activates fission yeast Spc1/StyI MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **9**, 1339-49.
- Smits, V. A. and Medema, R. H.** (2001). Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* **1519**, 1-12.
- Snetselaar, K. a. M., M.** (1997). Using microdensitometry to correlate cell morphology with the nuclear cycle in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **89**, 689-697.
- Snetselaar, K. M., Bolker, M. and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Snetselaar, K. M. a. M., C.M.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Sprague, G. F., and J. W. Thorner.** (1992). Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Steinberg, G. and Fuchs, U.** (2004). The role of microtubules in cellular organization and endocytosis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *J Microsc* **214**, 114-23.

**Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M. and Schulz, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-22.

**Talbot, N. J.** (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 177-202.

**Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. and Kuno, T.** (1996). The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* **16**, 6752-64.

**Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hartl, A. and Brakhage, A. A.** (2008). The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genet Biol* **45**, 618-27.

**van Drogen, F. and Peter, M.** (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**, 1698-703.

**Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. and de la Torre-Ruiz, M. A.** (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* **280**, 9149-59.

**Watanabe, Y., Irie, K. and Matsumoto, K.** (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **15**, 5740-9.

**Weber, I., Assmann, D., Thines, E. and Steinberg, G.** (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 225-42.

**Xu, J. R.** (2000). Map kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet Biol* **31**, 137-52.

**Xu, J. R., Staiger, C. J. and Hamer, J. E.** (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12713-8.

**Yin, G., Haendeler, J., Yan, C. and Berk, B. C.** (2004). GIT1 functions as a scaffold for MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation by angiotensin II and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **24**, 875-85.

**Zaitsevskaya-Carter, T. and Cooper, J. A.** (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *Embo J* **16**, 1318-31.

**Zapater, M., Clotet, J., Escote, X. and Posas, F.** (2005). Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle* **4**, 6-7.

**Zarzov, P., Mazzoni, C. and Mann, C.** (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *Embo J* **15**, 83-91.





## ANEXO 1

A continuación se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

**Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos usados durante este estudio.** Los nucleótidos mutados están resaltados y los sitios de restricción generados están subrayados. Las coordenadas se indican considerando +1 la adenina del ATG del gen correspondiente. Los nucleótidos cbx1-2 anillan en el gen de resistencia a la carboxina, los smut1-2 en el de resistencia a la higromicina, los nat1-2 en el de resistencia a la nourseotricina, los oligonucleótidos S-HA, AS-HA en el epítipo HA, el oligonucleótido gfp1 en la proteína GFP, los oligonucleótidos GFP-S, GFP-AS en la proteína GFP (flanqueada por *NdeI*) y los oligonucleótidos crg1 y nar1 en los promotores *Pcrg1* y *Pnar1*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Coordenadas
cbx1	TCTGGGTTTCGCGGAGATCTCACAGAGCA	
cbx2	AATTGCACAGATCAAGAAGGACATGGCCGT	
gfp1	ACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG	
crg1	GAGATCACGACACCGCGAGGTTTGCGGTGA	
nar1	GGTGAATAGTGAGAACAGTCTTCGATCACTCTG	
smut1	CGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG	
smut3	ATTCACGTTTTGTAGCACACGACTCACATC	
smut4	CACCACCAATCGACGCGGAAGGCAACCCA	
nat1	TGGCTGCTGATCACAGCAAGTCAGATT	
nat2	TGTACGCATGTAACTTATACTGAAAACCT	
S-HA	CGTCCCGGACTATGCCATGGGCTACCC	
AS-HA	GGGTAGCCCATGGCATAGTCCGGGACG	
GFP-AS	<u>CATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG</u>	
GFP-S	<u>CATATGGGGCACC</u> GGCGCCCGCACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC	
Bck1-1	GTGAGGTAGGATGAAAATCGTGAATCG	-1168
Bck1-2	ACGCACCACGCACGACCACAGACTCGT	-1100
Bck1-3	GTG <u>GGCCATCTAGGCC</u> AACGGTTGGATTGGCTTGA	-357
Bck1-4	CAC <u>GGCCTGAGTGGCC</u> ATTGCTTCATGCGGTTGC	+6033
Bck1-5	TCTATGTCCACCAACATGCTCATGGGT	+6563
Bck1-6	CTTGACAGCCCGGATAGCTCGGA	+6651
Mkk1-1	GATGGGCGTAGTTACGAGGATAG	-1000
Mkk1-2	GCCTGATGCAAGCAAATCAGTGTCACT	-900

Mkk1-3	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> AAGCAGCAGCACATACAGTC	-220
Mkk1-4	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCCC</u></b> TCACGTGCAATCTTAGTATG	+2055
Mkk1-5	CTCAAGCTTTTGTGTAACGATGGTGT	+2800
Mkk1-6	TGTACCGTTTCAGATATCGCGCTCTT	+2900
Mkk1-7	GAAAGATCATCTGGCGTGCCCTGTGCT	-2220
Mkk1-E1	<b><u>CATAT</u></b> GGCCTCGCTCATTCCACCGAAG	+1
Mkk1-E2	GAGCTGATCAACGACGTT <b><u>GCCGGC</u></b> GATTTTACGGGCACA	+1103
Mkk1-E3	TGTGCCCGTAAAAGTACCGGCAACCGAGTTGATCAGCTC	+1143
Mkk1-E4	<b><u>GAATTC</u></b> AGCAACATAATCAGATTGCAC	+2080
Mkk1-8E	<b><u>GAATTC</u></b> CGGCGTATACTCATACGCCAT	-2156
Mkk1-9B	<b><u>GGATCC</u></b> GCCTTTTGACCATCAATCTC	-1309
Mkk1-10	GCAGAAGCTGGCTCGCTAGATGCCATCTAC	+890
Mkk1-11	<b><u>TTAATTA</u></b> ACTCGGCAAGGTGGCCAGTGTGTTCTCA	+963
Mkk1-12	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> CGCGCTCCAGCTTCATCCTCATC	+2027
Mkk1-13	<b><u>TTAATTA</u></b> AGCTTTTGTGCTAACGATGGTTACGA	+2800
Slt2-1	<b><u>CATAT</u></b> GTCGGCACATCCATCAAAC	+1
Slt2-2	<b><u>GAATTC</u></b> CCTTGCCTGCATCAACTCCCTCTC	+1338
Slt2-3	CTCCCCGTCAAGGCCACCAACAGTCAC	-705
Slt2-4	AGTCACAACGTGTTGGTTCAAAGTTTA	675
Slt2-5	TTTCATGTGGGAATGGTATACCACCAA	+1978
Slt2-6	CAACGGCAAAGAGGGCGCACAGACGAG	+2013
Slt2-r	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> TTGTCTACGTCAAGATCA	-1
Slt2-f	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCC</u></b> ACAGCTCACCTCGCGGTC	+1343
Slt2-KF	<b><u>GGTACC</u></b> ACTCCCAGCTGTACAGTGACGTA	-1707
Slt2-KR	<b><u>GGTACC</u></b> GATTTTGACCGCGAGGTGAGCTG	+1366
Slt2-10	GCTGATCTTGACGTAGAC <b><u>CATAT</u></b> GTCGGCACATCCATCAAAC	-25
Slt2-11	GTTTGATGGATGTGCCGAC <b><u>CATATG</u></b> GCTTACGTCAAGATCAGC	+23
Slt2-A1	GGCGCAGGTTTCATG <b><u>GCAGAATT</u></b> CGTAGCAACTCGATGG	+563
Slt2-A2	CCATCGAGTTGCTAC <b><u>GAATTCTGCC</u></b> ATGAAACCTGCGCC	+602
Slt2-B1	GAAAGCGTAGCTATCAGAAAGATCACCAACGTC	+143
Slt2-B2	GACGTTGGTGATCTTT <b><u>CTGATAGCTACGCTTTC</u></b>	+176
Rlm1-1	TTCACAGACTAGGACTCCAATTCGTGA	-800
Rlm1-2	TTACCGAATTTGATTCCGAAACGCTC	-686
Rlm1-3	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> GATGATCTGATCGACTTTGGC	-1
Rlm1-4	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCC</u></b> AGATCAGATCGCTCGCCTGGT	+1781
Rlm1-5	TTGAGTCGTGAATCAGGTGAAGCGACA	+2400
Rlm1-6	AGTCACGAGTGGTGAGTGTGCTACGTG	2466
Rdl1-1	GAATCGTGCGTGGTCAGTTGTAAGTGG	-600
Rdl1-2	GTCGAATCACGAATTCTCGATTACGA	-500
Rdl1-3	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> GTGTGAAGAAGCCTGGCT	-1
Rdl1-4	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCC</u></b> ATGCTTACTGGATCTTCT	+3319
Rdl1-5	GTTGAGGGCCATGATCAAGGATATCGA	+3818

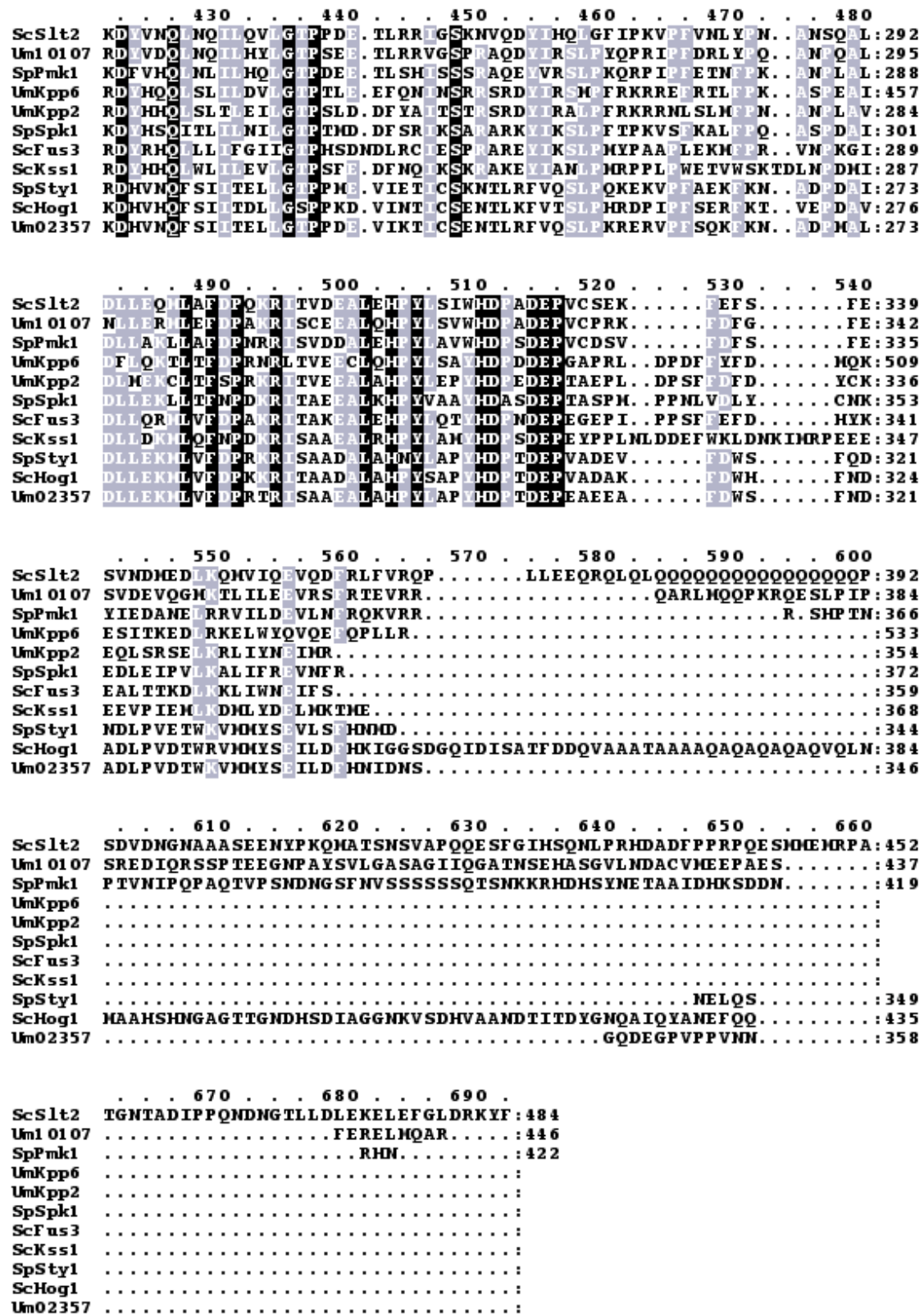
Rcl1-6	GAACGTGTCTGGCCATACTACCACAAG	+3870
Rcl2-1	CGTGAGTCAGTGATAATTGTTGAGCTT	-598
Rcl2-2	GCCGCTAACTAAGCAAGTCGTGGGTCA	-535
Rcl2-3	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> GATGCCGTGTTGGAC	-1
Rcl2-4	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCC</u></b> GTAGCTTTCCCTGTCTAT	+2185
Rcl2-5	ATTTCTCCATCCTTCAGCCGAACCTT	+3019
Rcl2-6	TCTCTGGTCGCATGATTACTTACCTCT	+3077
Spa2-1	GAATCGTGAATCGTGAATCGTGAATCG	-688
Spa2-2	ATACAGTCACGATTCACGTTTGTGATT	-554
Spa2-3	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> ATGGCGCAAAGAGTGGGA	-1
Spa2-4	CAC <b><u>GGCCTGAGTGGCC</u></b> TAAACGCGCAGCACATG	+3097
Spa2-5	GAGCCGTCGCTTCAAGGCTTGCTG	+3778
Spa2-6	GCCTCATAATTAATATATATACACAAA	+3871
Spa2-7	AAGAGGAGCGCGAATTGCATCGCACA	+1347
Spa2-H	ACACGCGCAGCAAAACCAGGTGGTCGTC	+1473
Spa2-B	GTG <b><u>GGCCATCTAGGCC</u></b> GTGCGAAACATCGGCATCGTT	+3074
Rho1-1	<b><u>TAGGATCC</u></b> ATGTTGGGCTGCACTGCG	-788
Rho1-2	ATGAATTCCAAGAAACGTGCGTTGCAGTTG	-737
Rho1-3	<b><u>CGCGCGGATCC</u></b> ATGTCTGAACTCCGCCGAAAGCTTGTC	-38
Rho1-4	<b><u>GGAATTC</u></b> GAGAAACATAGCTAAAAGAGCACTACAC	+1
Rho1-5	CTTTGGGATACCGCCGGT <b><u>CTAG</u></b> AGGATTACGATCG	+1225
Rho1-7	CGATCGTAATCCT <b><u>CTAG</u></b> ACCGGCGGTATCCCAAAG	+575
Rho1-8	GGTTGGCAATGCCACGATCAATCAGAC	+610
Rho1-6	CATGAGACGGCGTTTCCGATCCAAGCT	+800
Rho2-1	<b><u>GGCGAATTC</u></b> ATTGCCGAGAAGGGATGG	-808
Rho2-2	CGCGGATCCTAGCGATGCGAGAGGTGC	-770
Rho2-3	<b><u>GGAAGATCT</u></b> GCACCGGCAGCAATTCGT	-70
Rho2-4	<b><u>CCGGAATTC</u></b> ATCTCGGCATAACGAGCG	+1
Rho2-5	TGGGACACCGCGGGT <b><u>CT</u></b> GGAAGAATACGAGCGT	+1000
Rho2-7	ACGCTCGTATTCTTCC <b><u>AG</u></b> ACCGCGGTGTCCCA	+178
Rho2-8	AGCGAATACGTCAAGAACCAAACGCCG	+211
Rho2-6	<b><u>GGAAGATCT</u></b> ACGCTGTGCGGACTTGTG	+974
Rho3-4	<b><u>CCGGAATTC</u></b> GCACGATGTGTATGGTGC	+1
Rho3-5	TGGGATACAGCTGGT <b><u>CT</u></b> GAGGAGTTTGACAAG	+821
Rho3-7	CTTGTCAACTCCTCC <b><u>AG</u></b> ACCGAGCTGTATCCCA	+309
Rho3-8	GGGTGTCTCTGTAGCGGTTTCGACACC	+342
Rho4-1	<b><u>CGGGGTACC</u></b> GGACAGAGGTTCTGGCCC	-970
Rho4-2	CCGGAATTCCTGAACAGCTTTACGGCA	-918
Rho4-3	<b><u>CGCGGATCC</u></b> AACGTTTACAACAGTGGC	-62
Rho4-4	<b><u>CGGAATTC</u></b> GGTACCAACGTGGACCAAGACA	+1
Rho4-5	TGGGATACAGCAGGG <b><u>CT</u></b> GGAAGAATACGATCGC	+900
Rho4-7	GCGATCGTATTCTTCC <b><u>AG</u></b> CCCTGCTGTATCCCA	+252

## Anexo

Rho4-8	AAAGTATACCATATGACTGAGAGATTG	+285
Rho4-6	GCTTGAGCTGGAGG <u>CTGC</u> AGCTGCCCTGGGCAC	+1000







**Figura 61. Alineamiento de las proteínas MAPK de *U maydis*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*.** En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.

	190	200	210	220	230	240	
SpWis1	FEVVNKISSP...	TPIVGNGQGRG	SYPLPNSQLAGRL	SNSPVKSPNMP	ESGLAKSL..	AA:215	
Um1 5092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
ScPbs2	LLNPNRRAPRRPL	STQHP	TRPMVAPHKAPAI	INTPKQSL	SARRAVKLPPGGMSL	KMP TKT:238	
UmFuz7	GK.....	.....	.....	SSAVTPGGSLALP	.....	68	
SpByr1	.....	.....	.....	EELIN.....	.....	32	
ScSte7	QNNSNLFLRR.....	GIK..	KKLTDAFGDDQAISK	PNTVVIOQPONEPVL	.....	97	
ScMdk1	DGKHDLGLKQ.....	R.VIAEMELSGM..	SDLTPSSMASPF	SHTNTSSP...	Y:155		
ScMdk2	ERFSNLHVD.....	ITYKEL.....	LSSAPISTKLSNIDTT	.....	F:146		
Um1 0855	QMYTAITDDL.....	RAAIGGMSITDSDGER	LDASGLRIPVTGGKSSSHG	..	YW:158		
SpSkl1	.....	.....	ERNDMQGI	VEIT.....	35		
	250	260	270	280	290	300	
SpWis1	ARNPLLNRP	TSFNRO	TRIRRAPPGKLDLSNSMPT	SPV....	SPSSMASRRGLN..	IPPTL:269	
Um1 5092	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
ScPbs2	AQQPQQFAP	SPSNKKHIE	TLSNSKVVEGKR	SMPGSLINGVQST	STSSSTEGPHD	TVGTTP:298	
UmFuz7	VKNGLDTEPN	SGAN.....	YHN.....	KLTOQLANLEL	GVEY:100		
SpByr1	..NQKSFESHVEA	.....	.....	FMEQCAHQRPAW	57		
ScSte7	VLSSLSQSPCV	SSSSSLSTPC	IIDAYSNNFGLSP	SST...NSTP	STIQGLSNIA	TPVEN:153	
ScMdk1	LRNDLSNSVGSD	.....	FSMLISAYEQSSSP	IKSSSQ....	PKSSSESYIDL	NSVRDV:204	
ScMdk2	IKKDLDTPEGED	SY....	PSTLLSAYDFSSSG	SNSAPL....	SAMNIISC	SMLIQGKDV:197	
Um1 0855	MTNDSATASINA	.....	DGTEPNGADVSSQP	SQSRT.....	RTDSSASA	STRASMQG:206	
SpSkl1	...DLVFSSE	.....	SKLTQRKE	.....	SRDSKTFVP	SFLEELDD:67	
	310	320	330	340	350	360	
SpWis1	KQAVSETP.....	FSTFSDILD	AKSGTLNFKMKAVLN	SEGVMTSSGSSFR	INMS:318		
Um1 5092	.....	.....	.....	.....	MA:2		
ScPbs2	RTGNSNNSSNSG	SSGGGLFAMF	SKYVDIKSGSLN	FAGKLSLSSKGIDF	SMGSSSRITLD	358	
UmFuz7	KL.....	.....	DLKN.....	.....	E:107		
SpByr1	IS.....	.....	DLDN.....	.....	S:64		
ScSte7	EHSISLPP.....	LEESLSPAAADL	KDITLSGTSNGN	.....	YIQLQ:189		
ScMdk1	DQLDENGW.....	.....	KYAN.....	.....	LKD:219		
ScMdk2	DQLEEEAW.....	.....	RFGH.....	.....	LKD:212		
Um1 0855	GHDDEL.....	.....	V.....	.....	LAG:216		
SpSkl1	DHLHEL.....	.....	V.....	.....	TNG:77		
	370	380	390	400	410	420	
SpWis1	EIKLEELGKGY	GVVYKALHOP	TGVTMALKEIRLS	LEEATFNOIIME	TDILHKAV..	SP:376	
Um1 5092	ELELMDELGKGY	GVVYKALHOP	TGVTMALKEIRLS	LEEATFNOIIME	TDILHKAV..	AP:60	
ScPbs2	ELEFLDELGHG	YGVVSKVLHCK	PNVIMATKEVRLE	LDEAKFRQILME	IEVLHKCN..	SP:416	
UmFuz7	DLKTLSELGAG	NGGTVTKVLHEK	SGTVMAKVVVID	AKPSVRKQILREL	QILHECN..	SP:165	
SpByr1	SLEVVRLHGE	NGGAVSLVKHRN	..IFMARKTVYVG	SDSKLQKQILREL	GVLLHCR..	SP:120	
ScSte7	DLVOLGKIGAG	NSGTVVYKALH	VPSKIVAKNTIP	VEQNNSTIIMOL	VRELIVKMKVP	HE:249	
ScMdk1	RIETLGLGEG	GAGGSVSKCKL	KNGSKIFALKV	INTLNTDPEYQKQ	IFRELQFNRSFQ	SE:278	
ScMdk2	EITTLGLGEG	GAGGSVAKCRL	KNGKKVFALNT	INTMTDPEYQKQ	IFRELQFNKSFK	SD:271	
Um1 0855	NFEMLSRLGE	GASGEVHVRHRP	TGLIDAKNTIST	PNPAIHROILREL	AFNRSCH..	SD:274	
SpSkl1	GILYNSLGE	GVSGSVRKCR	IRGTOMIFADIT	VLAA..PNTALQK	OLLRELKINRSCT	SP:135	
	430	440	450	460	470	480	
SpWis1	YIVDFYGAFF	VEGS...VF	ICMBYDAGSLDKLYAG	.....	GIKDEG.....	VLAR:419	
Um1 5092	QIVDFYGAFF	IESC...VY	ICMBYDAGSLDKLYGDR	.....	GSVPED.....	VLAR:104	
ScPbs2	YIVDFYGAFF	IEGA...VY	ICMBYDAGSLDKLYDESSEI	..GGIDEP	.....	QLAF:463	
UmFuz7	YIVSFYGA	YLNPH...IC	MBYDAGSLDKLYGDR	.....	GPISPE.....	ICGK:209	
SpByr1	YIVGFYGA	FQYKNN...IS	LCMBYDAGSLDKLYGDR	.....	GPILPD.....	ILGK:164	
ScSte7	NLITFYGA	YINQHINNE	IILMBYSDCGSLDKIL	SVYKRFVQRGT	VSSKKTWFN	ELTISK:309	
ScMdk1	YIVRYG	MTDDENSS..IY	IAMB YMGGRSLDAIKMLLER	..GGRISEK	.....	VLGK:328	
ScMdk2	YIVQYGM	TDEQSSS..IY	IAMB YMGGRSLDAIKMLLER	..GGRISER	.....	VIGK:321	
Um1 0855	YIVRYG	AFLEEQDTS..IA	TOMB YAEAGSLDAIKKVKSR	..NGRTGEX	.....	VLGK:324	
SpSkl1	YIVKYG	ACYNNAECQ..LN	IAMB YCGAGSLDAIKKRVRSQ	..GGRTGER	.....	PLGK:185	
	490	500	510	520	530	540	
SpWis1	TAAYVQGLK	KEEHQIDHRD	VKPTNVLVNS	NGOVKCDFGVSG	NLVASISK	INIGCQ:478	
Um1 5092	ITGSMVRGL	SFLKDELQIDHRD	VKPTNVLVNS	NGOVKCDFGVSG	OLEKSLAK	INIGCQ:163	
ScPbs2	IANAVIHGL	KEKEQHIDHRD	VKPTNVLVNS	NGOVKCDFGVSG	NLVASISK	INIGCQ:523	
UmFuz7	IAYAVSHGL	TIDYVHRIDHRD	VKPTNVLVNS	AGQIKICDFGVSG	ELINSIADTF	VGTS:268	
SpByr1	IINSHVKG	LIMYNVLHIDHRD	VKPTNVLVNS	RGEIKICDFGVSG	ELINSIADTF	VGTS:223	
ScSte7	IAYGVNLG	DHLYRQYKIDHRD	VKPTNVLVNS	KGQIKICDFGVSG	ELINSIADTF	VGTS:368	
ScMdk1	IAEAVLRGL	SLHEK..KVID	HRDVKPNTILLNE	NGOVKCDFGVSG	EAVNSLATTF	TGTS:386	
ScMdk2	IAEAVLRGL	SLHEK..KVID	HRDVKPNTILLNE	NGOVKCDFGVSG	EAVNSLATTF	TGTS:379	
Um1 0855	VAECVLKGL	SLHEK..KVID	HRDVKPNTILLNE	NGOVKCDFGVSG	ELINSIADTF	TGTS:382	
SpSkl1	IAYGVNLG	DHLYRQYKIDHRD	VKPTNVLVNS	KGQIKICDFGVSG	ELINSIADTF	TGTS:243	



	550	560	570	580	590	600	
SpWis1	SYHAPERIRVGGPTNGVLTYTVQADVWSLGLTILEMALGAYFPYPE	SYTS.....	528				
Um1 5092	SYHAPERIK.GESQNMGLTYTVASDVWSLGLSHVETTLGTYPYPE	TYSN.....	212				
ScPbs2	SYHAPERIK..SLNPDRTYTVQSDIWSLGLSILEMALGRYPYPE	TYDN.....	571				
UmFuz7	TYHSPERIQ....GD...QYSVKSDVWSLGVSTIELALGRFPFAENEEDDDSDADNNYTN		321				
SpByr1	TYHSPERIR....GG...KYTVKSDIWSLGLSILELATQELPWSFSMIDD		266				
ScSte7	TYHSPERIQ....GN...VYSIKGDVWSLGLHIELVTGEFPLGGHNDTP		411				
ScHdk1	FYHAPERIQ....GQ...PYSVTSDVWSLGLTILEVANGKPCSSSEKMAAN		430				
ScHdk2	FYHAPERIQ....GQ...PYSVTCDVWSLGLTILEVAGGRFPFESDKITQN		423				
Um1 0855	FYHAPERIR....GL...AYTITSDVWSLGLTILEVASNRFPFPAEGEPP		425				
SpSkh1	YHAPERIS....GG...SYTISSDIWSLGLTLHVALNRRFPPEGSPP		286				
	610	620	630	640	650	660	
SpWis1	.....	IFAQ	SAICDGDPPSL				544
Um1 5092	.....	VFAQ	QAIIVHGDPPPEL				228
ScPbs2	.....	IFSQ	SAIVDGDPPPRLL				587
UmFuz7	EDLAGTLSP TKPAPMISLQONEKQRRRKSKPAGVSLEGSSHQMSILDLQHIVNEPPPKL						381
SpByr1	.....	SIG	ILDLLHCIVQEEPPRL				285
ScSte7	.....D.....G.....		ILDLLQRIVNEPSPRL				429
ScHdk1	.....		IAPFELLMWILTF T.PEL				447
ScHdk2	.....		VAPIELLTMLTFS.PQL				440
Um1 0855	.....		LGPIDLLSYVVNKKVPEL				443
SpSkh1	.....		PMPIELLSYIINHPPLLL				304
	670	680	690	700	710	720	
SpWis1	P.....DS.FSPEARDFVNKCLNMP SLRFDYHELANHPWLLKYQN						595
Um1 5092	PP....EL.YSETARDFVAKCLEKIPARRPTYAQLLEHEFLTEDAAKGEEGVDHVGWVER						283
ScPbs2	PS....DK.FSSDAQDFVSLCLQKIPERRPTYAALTEHPWLVKYRN						639
UmFuz7	PE....GR.FPKHMEEFVNLCLLQDPAKRPTPKDLTKHQYVIDADAA.KVD						433
SpByr1	PS....S..FPEDLRLFDVACLHKDP TLRASPOQLCAHP YFQQALML.NVD						336
ScSte7	PK....DRIYSKEMTDFVNRCCIOMERERS SSIHELLHDDLIMKXVSP						484
ScHdk1	KDEPESNIIWSP SFKSFIDYCLKKDSREPSRQMINHPWIKGQMKK						504
ScHdk2	KDEPELDISWSKTFRSTIDYCLKKDAREPSRQMLKHPWIVGQMKK						497
Um1 0855	QDDEKAGVKWSRALRDFIERCLEKEPTKRP GPHKMISHPP IRKSETR.QPQPDIAKFVAD						502
SpSkh1	P...QEPGIKWSKSFQHFCLCVCLDKDKTRRPGQKMLTHP WVKAFER						359
	730	740	750	760	770	780	
SpWis1	ALKEKGEKRS.....						605
Um1 5092	AIDARTRKKEQVNGTSAPGSSSTPSEA						310
ScPbs2	RLERRNKILRREGENGLSKNVPALHMGG						668
UmFuz7	HK.....						435
SpByr1	FRSS.....						340
ScSte7	IKSKIKEDKR IKREALDRAKLEKKQSERSTH						515
ScHdk1	C..WKD.....						508
ScHdk2	C..WEKEKDG I.....						506
Um1 0855	VYGSYLPSSIANQQEQTP TQATTKSATLGRIPSVRSAPVATAALTAMTNDQPIPVPT						562
SpSkh1	V..WSD.....						363
	790	800	810	820	830	840	
SpWis1	.....						
Um1 5092	.....						
ScPbs2	.....						
UmFuz7	.....						
SpByr1	.....						
ScSte7	.....						
ScHdk1	.....						
ScHdk2	.....						
Um1 0855	SVTATATATATQFGAPPC IAPATQASRSIGAPSDRLRLTPKISVTIDEQARTEPTNEPPE						622
SpSkh1	.....						

**Figura 62. Alineamiento de las proteínas MAPKK de *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*.** En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.

```

      . . . 190 . . . 200 . . . 210 . . . 220 . . . 230 . . . 240
SpByr2 . KEVAEWLKSIGLE . . . . . K: 20
UmKpp4 . ADVASWLNARLG . . . . . H: 75
ScSte11 . PFVQLFLEEIGCT . . . . . Q: 36
ScSsk22 . . . . GRVLAPHTIS . . . . . : 26
ScSsk2 . IPQGQFFHQNAISGSSSSSARSSRRP SNIGLPLPKNPQQSLPKLSTQPVFVHKVVEASK: 150
SpWis4 . ISPTMSYTNHSPAN . . . . . LTRNSSFMHQ: 115
SpWin1 . FSEAFRMAEQPPAEALTISTPVDPINID . . . . . E . LDRAVAVSPS: 127
Um01544 . TDTAPTVEDSP TQQRIPAAGLG . . . . . TRTQPRRAP: 133
SpHkh1 . NSVLQFLKLYKFN . . . . . KE: 48
ScBck1 . TLEMP TSF TNSSYKN . . . . . DN: 110
Um01662 DAQSASHLP SPARE SHTGRRP SISAVG . . . . . SSSTTSPLTT: 184

```

```

      . . . 250 . . . 260 . . . 270 . . . 280 . . . 290 . . . 300
SpByr2 . YIEQFSQN . . . . . NIEGRH . . . . : 34
UmKpp4 . YASIFAEH . . . . . DIRGSV . . . . : 89
ScSte11 . YLDSFIQCN . . . . . LVTEEE . . . . : 51
ScSsk22 . . . . SKLVKR . . . . . LSSHSS . . . . : 38
ScSsk2 . TESEIIKKPAPVNSNQDPLL TTP TLVISPELASLNTTNTSINSTPON . ITNQTSN . . . . : 204
SpWis4 . HYSTTLRS . . . . . PPSHRGR . . . . : 130
SpWin1 . DTSMLLHP . . . . . PTSSSSI . . . . : 142
Um01544 . RSSSSLRH . . . . . VTTRTR . . . . : 148
SpHkh1 . WEDVFIKS . . . . . RIEMDLF . . . . : 63
ScBck1 . GPSSSLSDS . . . . . RKSSGGNSVNSL: 130
Um01662 PLSP TLSSRSSAAGGGFFASLRP SSPGNLP ISTSKPQDGDNLGKPRRP SSVFDHVGNVWE: 244

```

```

      . . . 310 . . . 320 . . . 330 . . . 340 . . . 350 . . . 360
SpByr2 . . . . LNHLLTPLLKDLGIENTAK . . . . . GKQFLKQR: 61
UmKpp4 . . . . ILDVDQAALKEMGITMVKDR . . . . . VRISAAIKLLNKR: 122
ScSte11 . . . . IKYLDKDLIALGVNKGIDR . . . . . LKILRKS: 78
ScSsk22 . . . . HKLSRSDLKALGGSETISD . . . . . GPSQLTFKDRYVFNES: 73
ScSsk2 . . . . KHIP TRSQPNGSTSSSTLQDIVTTNSSQRS . . VGHGGSTSLRTYKKQYVLNEQ: 257
SpWis4 . . . . GIDVNSSHYPHISRPTSSD . . . . . S . . . QKMYTRAPVDYIIQEN: 168
SpWin1 . . . . PIP IKNAGHSNLDHP IRP SL . . . . . Q . . . SSISSNRRIKSPGIKED: 180
Um01544 . . . . TTSL SQPLPEDRDL SMDPNYFDHP . . . . . T . . . TSLVARQVNVKRRRAER: 190
SpHkh1 . . . . INLADQSKAEFAFKNKL SK . . . . . ESAIQLSSCIRKT: 96
ScBck1 . SFDKL ILSWDP TDP DEWTHQHVTSWF KFHDFP . . . . . ESWILFFKKHQLFGH: 177
Um01662 RFGRKVHHTRTATSEHHSSSSSHTRRSASQASPP IGLTPE SADPFD TARNSP SGSEFISQA: 304

```

```

      . . . 370 . . . 380 . . . 390 . . . 400 . . . 410 . . . 420
SpByr2 . . . . . : 61
UmKpp4 . CADSAVAR . . . . . RPSVVSISPLPLASHPLYAH . . . . . EGEI: 155
ScSte11 . KSFQD . . . . . KR . . . . . IEQV: 90
ScSsk22 . LYLKLLKK . . . . . TALDDYYTRGIKL TNRYEEDD . . . . . GDDEI: 107
ScSsk2 . LYLRKHNRN . . . . . RAMDDYYTRGIVASSNFEDDEENT SNK . . . . . GEDDL: 297
SpWis4 . PYFMN . . . . . IDQDSISDKSLP STNQSLHHS . . . . . EEDT: 198
SpWin1 . DYMHGRSISSPH . . . . . IDVEHINSTAVP SKTKNLPEKPKRSHKLRNSTITFAKIEDHP: 234
Um01544 . QRRQDAALLADSDDDQDDDDDL YASNSSADEAVEARRRRNAQAAASTDE YDYF SRSGSSY: 250
SpHkh1 . LLAPS . . . . . STRVP SKNSSYE TL TYSAKDS . . . . . SDDV: 126
ScBck1 . RF IKLLAYDNFAVYEK YLPQTKTASYTRF QQLLKKTHTKN . . . . . VTNS: 221
Um01662 SP SQSTTTDSECRTPATPGGEPQAQLSTPQPLP SAPAYTSVSALDSSVN . . . . . APQQE: 358

```

```

      . . . 430 . . . 440 . . . 450 . . . 460 . . . 470 . . . 480
SpByr2 . DYLR . . . . . EF . . . . . : 67
UmKpp4 . EYLQHDHTADP SADGSGSNF GLNSMGHRRGQ . . . . . HR . . . . . : 188
ScSte11 . NRLKMLMEKVSSLSTATLSMN . . . . . SE . . . . . LI . . . . . : 115
ScSsk22 . IRLSN . . . . . GDRIDEDLHSGVKFFSTTP . . . . . : 131
ScSsk2 . ELEMDDL . LKVEGEDKDMDFNFGYNT ITSTKNONEVVS . . . . . MSLNYLK: 342
SpWis4 . ESDNDFS . . . . . ESIHPEFDID . . . . . : 215
SpWin1 . ERKSQRLRL SSSLKCFDPE YDYNDP SL SIRR . . . . . DSS . . . . . T: 269
Um01544 . DQAKAKASIPPP SNRATLWSSASASESDDDWDGEP . . . . . C: 287
SpHkh1 . FTETNSGFRSSNQNSSLKSFQS . . . . . : 148
ScBck1 . HIRQKSA SKLKSSRSSSESIKSKLKNSKSQEDISMS . . . . . R: 258
Um01662 EAEELPYLAPE SPRPQPSFNTIGSPRIP SGQRSATSHR . . . . . RTSSLLERVLIQVTDD: 413

```

```

      . . . 490 . . . 500 . . . 510 . . . 520 . . . 530 . . . 540
SpByr2 . PRPCILRFIACNGQT . . . . . : 82
UmKpp4 . PPPLTLKQSTSRGMPGYASPAQSINQSQGFGLSAARGLTPG . . . AARGS . . . . : 234
ScSte11 . PEKHCVIF ILNDGSA . . . . . : 130
ScSsk22 . . . . YCRKHRSDS . . . . . DE . . . . . : 142
ScSsk2 . GKLDWLRLDVNNNDQPCIEDEEW . . . . . HSI . . . . . LGSED . . . . : 372
SpWis4 . VF YKVSNI LYDESD . . . . . : 229
SpWin1 . YF SNVNETYDEEDSDLDSETSTVNWVQSV . . . . . LNLPS . . . . : 304
Um01544 . LQLATASSLVERALGPPLDP TALPVD SGAGITATPGPSFPLD . . . . . LHTPA . . . . : 334
SpHkh1 . VPDSNVNVFGGFGG . . . . . : 162
ScBck1 . STSE SALSPTKSGP SKTDEKN . . . . . : 279
Um01662 NERF SVVDISGVDSADA IKRMFAKLHLFDADHSSFQLFRTE IGQSEATGPVVSDALLV: 473

```

	550	560	570	580	590	600	
SpByr2				RAVQSRGDIYQKTLAI			97
UmKpp4		VWNTASSSSATSKPGTPD	GALHRKVNISIGGVAAPLAVGASSSL		SSS		280
ScSte11				KKVNVNGCFNADSIKKR			147
ScSsk22			LAWNEIATERFKWQSHLARVLKGDIVKGEKTRIANQVK		KPGL		184
ScSsk2		LLSK.LLQNP	MVNNRFEWQTMLSKVLKGDIVRNEKTKIANQVK		GPGF		418
SpWis4			LQDPEKRERLEWHSMLSSVLKGDVHQTEKRRLRLTEP		DGH		269
SpWin1		LLSDDLHAMPKNKERFEWQYMLTSVL	TGDIVRSEKLRRLRKIASREGR				352
Um01544		DPNEHE TP ILNPQHRMEWQSHLGSVL	NSEVLKSE TKRINSVDTP		DLS		381
SpHch1			SVVDNELLSTGKNSHQTTSLNLEGS				188
ScBck1			FLHSTSTHQTKKSASSLYRRSFI	SLRGSSSSNASSAKSP SNIKLSI			325
Um01662	LCLQMGDDRGTCLKFLVQQI	APPNNSTVRALPPP	TSTIVSQRA INNIRRTSGTGSAPGQHL				533
	610	620	630	640	650	660	
SpByr2							97
UmKpp4	RHPYGHAVHSNRP	STATGA	SGYSTVPASQSLRSNHTSSSP	TATSGFSNI			329
ScSte11							147
ScSsk22	NKELSDEIWLELKAWLN	GR	TMQEMEQLTYLRDSSDSVFEEIMKFQIPQ				233
ScSsk2	NTQFSDDIWIELKAWHNGR		TVEDQNKSLRIFRDSTDVSFQEIMAFKLED				467
SpWis4	SGTYISEVWLGLQAWLHGR		LNADQAEVIRKSREGVEPVLREV	IDFQIQD			318
SpWin1	NSDYSDNLWMEIWCWL	THR	SVDSYREMLKHLRTGMVDVLLAIHMFHWD				400
Um01544	RQELSYQRWLDIKATLRGRGMHRDATDEEEKRLKEGFGKMLKDLVQE		IRDCRSHHIALAD				441
SpHch1	PINLHAYKG	TVTSIIMDDSRNINKKTL	SKQPVSEHKEKQTSFLRRFRVPG				238
ScBck1	PARPHSIIIESNSTLTKSASP	PASP SYP SIFRRHHKSSSSSESSLNSLFGSG					376
Um01662	RTESSSKSSSLSDALVYPENIGADAAHEGSMNRNSGSSL	TRSKAQTRRALP SAPPVDDLRL					592
	670	680	690	700	710	720	
SpByr2							97
UmKpp4					NAASARP	STATGAQ	343
ScSte11							147
ScSsk22					GKI	LSLDALEA	244
ScSsk2					N	MSADEAAE	476
SpWis4					E	ETTKPPLE	327
SpWin1					E	SNELTPIV	409
Um01544	GSSLHASSASPVTTP	SESAQVASPERDP	SAQDASRG	FEPEKADSDAEAAVLAENKMLA			500
SpHch1							238
ScBck1						IGEEAPTK	384
Um01662					SP THSCISSTTQSAVQDRRSIA		614
	730	740	750	760	770	780	
SpByr2							97
UmKpp4	SYTTNVPGTSSARDGY	SPLTP ISESNLGNTP	TTPSGIQQQQSSAGYAVGRGPF	ASSQRY			403
ScSte11							147
ScSsk22	ILQDLHNRVYHSVVSYNPMLKKHYKDKP	ITNTAEFTARIDVHNSWLNFKTNLTLLRRQELDD					304
ScSsk2	TIKSLVDKYRVLNLWPNIKRMHAEKPI	TKTEAFRRNRIDTLNSWLNFKTFNFDNIAYLKK					536
SpWis4	QVTEILEKVEQCKQFYISSREMEENVPLSASKEFNKYNLALISWSNVMSIQVETLVLOK						387
SpWin1	AVDMHLQKLDKYLERYPSRRSILQEHSLYASESFQHKLDVLTAYSNTVTHALEIQVNIIRS						469
Um01544	EIGQLLERIDSAAEQFPTKRAIEIVPEWGDADVQAKLAAIYSWYNTTSLRLQISILRK						560
SpHch1		F SRDKDKTKDCPSSNSMPPH	LASNVKTLDA	SLDQGEWVPIHR			282
ScBck1	PMPQGHSLSSEMLAKGKSKHYETNVSSPLKQSSLP	TSDDKGMLWNKF KRKSQIGVSPNT					444
Um01662	SSGDGSANESWARHGASASDGAPSAIPTQRSSSVNANASAAQSSSSGSAGRHP	SNLEDDR					674
	790	800	810	820	830	840	
SpByr2						ALK	100
UmKpp4	AAS		SVP SQQQPSSGHTLRHVDSGEGYNLAGYQNP	NPTLEDLKRRTIK			451
ScSte11						LIRRLPHE	155
ScSsk22	WIN		RFSPISSSDNCQEDFDGVQPWNCK	MKILAEQLMKEKNIES			347
ScSsk2	WIVG		NKELESTTEVDNTTVNLDDPAVFATN	CKRFAEQIMKEKDIEL			582
SpWis4	WVG		NDEFDLTHRTTP	QFNVDGVENT	SSFVERIFIQSGDLQ		426
SpWin1	WVG		NEEMDITKNTTNSINNVSQISM	GPFVERFYRETGLIR			509
Um01544	WTGSESELELTSHNARDYDTQLKKGESQSHNHDRDQOSTARAAADDSTFVERIQEGSLQS						620
SpHch1					LESQIGLISKKK		294
ScBck1	VAYVTS		QETPSLKSNSSTATLTVQ	TADVNI	SPSSSPPP	IPKTANRSL	493
Um01662	QRYDAEPG	VNRS	LHAPATGSSSHWQERSDEGARESLRVQTTAQLPGLTLHNAKSHD				729
	850	860	870	880	890	900	
SpByr2	KE	SLEDASKFIVCVSQS					117
UmKpp4	FISEEDNTTRIVNV	SDCRDAYDVHARVLKKFGKPPSGNSYTP	TADQGP	TGDELGATE	TWG		511
ScSte11	LLATNSNGEVT	KMVQDY					173
ScSsk22	IFQKKIF	YPLSPWFMKLKHLFIVYRETLTKMNIKYPYER					386
ScSsk2	IFQKKIFFPLAPWILKAKFFFLKYQKTWNELNLSYLDQD						621
SpWis4	TFEQRTL	TTLNRIHQAKQTSINENAAQAF	EENKLP	TYEDK			465
SpWin1	APEQR	IMTHNSVLSKVCNTIVTYADDLSYGLPLIADD					548
Um01544	TFEKRTL	ASLQYLTAKKETILKYHKEFKRMALPPFEP					658
SpHch1	SEVLAT	THDDMKFTVVDITN					313
ScBck1	VISTEDTPKISSTAS	TFKEKTYDPD	INPDKTV	PPVNNQKYSYKN			538
Um01662	DLHRP	SOSASOPSTLTOAEVRKQAGHNDGRVYTPA	IMRP	STAAPAGAG		ARESA	784



	910	920	930	940	950	960	
SpByr2	.....SRIKLITEEEFKQICFNSS..	SPERDRLIIVPKEKPCPSFEDLRRS.....	161				
UmKpp4	IFATSADGQNTKALSDNELLAI	CHAPQPHDPLRERGLTLRRIPNHLPGEDARKVPV.....	567				
ScSte11	VFVLDYTKNVLHLLYDVELVTIC	HANDRVEKNRLIFVSKDQTPSDKAISTSKKLYL.....	229				
ScSsk22	..LRSLLAFFPVYL	IKREVILTRL SYARKLKNP THQIDQMIIDDFNAFIRLSVQLKYT.....	440				
ScSsk2	..LEFLLMFMR	LVKDIIIRLSYAKKIQNPTLHMIDQMHDDFSTYIKLAVQMKFT.....	675				
SpWis4	..LLPLVRFP	IKLEEFALRLRLAYAKKIKGNFLIVDSHMLDDFKIALSVAVRIKRE...Y:	520				
SpWin1	..YMRLLSFP	FLIKEFLMLRLSCAENITSISLFTIDSLDDLRNTHKVAVHIQQ...H:	603				
Um01544	..ELITLISFP	TRLMQAGALRLRLDYAGKLAEP SVLIVDSL TDDLRTALAMACRVKLH...Y:	714				
SpHdh1	..VQNA	TQLRKLIASMYLDISIDQF DLFLTEVGGAQYIEILDDRKLDIARLYSD....:	366				
ScBck1	LLDQKF	YPLKKTGLNDSNKYILVTKNVSVFVPLMLKSVAKLSSFKESALTKLGIN....:	594				
Um01662	SSHRQYSSDALGSSRS	SPQEP TLGLDPRMLQRNRSAQAAIPSGQQLVNHGPTRMSSSTP....:	841				
	970	980	990	1000	1010	1020	
SpByr2	.....	WEIELAQPAALSS.....	QSSLSPKLS.....	183			
UmKpp4	....RSGRN.....	KLEAFFGERMPVAQMOPAGPGSGVNADEEDAGSVTISGKKH:	613				
ScSte11	....R.....	TL SALSQVGPSS.....	SNLLAQMKG.....	251			
ScSsk22	..LTKYCS.....	NLPFDVDFDP TFENTV IEAIRYLFFLLMLKLIDSSKQNTKA:	487				
ScSsk2	..VASYCN.....	DWFFKVKIDPEFDHTVVEGLE YFFSILELRILYSGKNSFKT:	722				
SpWis4	IKIASPSP.....	GWSLPTNVDEYDNLVLLDSLKF YFKLLTLKLSSGNKMLYFK:	569				
SpWin1	TVLIKPF.....	DDSKFVDENQSLNMLVASLKF YFNLLHRKVRNGCALLHFK:	652				
Um01544	TSIIVADP.....	ERGWDLSPCIAEGYDDVLRSAKFFKLLRLKLKAS...VYFK:	762				
SpHdh1	....EFG.....	TIKFFVKP SQNEE SGHSDTYLSFGTKSSSTYKADDDSIYH:	410				
ScBck1	..HKNVTF	HMTDFDCDIGAAIPDDTLEFLKSLFLNTSGKIYIKDQMKLQKPKPAPLT:	651				
Um01662	..QIRSPFMQHV	YLGQGQIDPRFNTQPPHSAHPMQAHP SNHVARPPYSAAPSFASQPAYQ:	899				
	1030	1040	1050	1060	1070	1080	
SpByr2	.....SVLP.....	TSTQ.....	KRSVRSMNAK:	201			
UmKpp4	KRA.STVSIMSGLDGP	FSSSSHNTGAGHTHGSTRAEGKLLS.....	KKESKHHSFP:	664			
ScSte11	.....IS.....	HQNAEG.....	KLRIDNTEKD:	269			
ScSsk22	.....PDLLLKYNDHLKNTG	HYINGAETVI.....	PMEFLKLTLR:	522			
ScSsk2	S...KEPDLLLKYWEMFR	NVGYIIDDAGELI.....	AAEFTKLTLR:	760			
SpWis4	....EIDFLENE	WAFLEMEHIYWIINGGDIHM.....	AGQFSYLSNS:	605			
SpWin1	....ETEILEGE	WDFLLAVCPHIEHGFQIM.....	SKSLSSLVGE:	688			
Um01544	....ETEILEPE	WRFLSTAVESIEGGDIIV.....	AINITRFVNK:	798			
SpHdh1	R...KEDFKKQ	PSXPVLTSDFEITDAGPNL.....	SLSGHQPDNK:	447			
ScBck1	SENHNVPLKSVKSKSS	HRSGTSSLIASTDDVSIVTS.....	SSDITSFDEH:	696			
Um01662	SQSFQGAALRP	MHGFGVNEFGARAPASVNFNTYHG.....	HDPRIHNASAMQGS:	948			
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	
SpByr2	PFES.....	YQRPPS.....	ELINSR:	217			
UmKpp4	PVTSKPSKI.....	RNFFGQRPSS.....	ELINTM:	689			
ScSte11	RIRQ.....	IFMQRPSS.....	EFISTM:	287			
ScSsk22	LVHKLQF	YL.....	LK...QQMPPP.....	TFANAS:	545		
ScSsk2	LVHRLHAYL.....	LR...QQNTPP.....	KLENEA:	783			
SpWis4	LLNVHRYV.....	ES...HLNGP.....	TERTAA:	627			
SpWin1	ILTINIRYL.....	KD...QLQGP.....	DTDDSA:	710			
Um01544	LFDR	IARYFNREL TATIAHQDPHARRLPNPASGPVGLAKSDPPTAGRA.GQEKNFITLE:	857				
SpHdh1	YKGFSSAP.....	NLAVVPELP	SRRFRG.FEKIRGAKGE:	481			
ScBck1	ASGSGRRYP.....	QTPSYIDRVSN.....	TMPTEE:	723			
Um01662	LTPRPYS	YEQP.....	S...MHQQQPMYRPYAQPSLVTASP YRTREDPF:	990			
	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
SpByr2	ISDFFPDHQP	KLLEKTIISNLSRLNLSIRTSQGHN.....	251				
UmKpp4	LADFFP	STDSKALQRTARRSIYGRASASTRSKRNSTWSF.....	728				
ScSte11	LAGYFP	PHTDMKRLQKTHRESFRHSARLSIAQRRP.....	321				
ScSsk22	EAEKWL	SSIFENLGANKRKLNRFSNILVKAFQNSAVYQI.....	584				
ScSsk2	AAEKWL	VQIFEILGSHKRLNRF TNILTKAFQNFVRYKI.....	822				
SpWis4	SLTNWY	STLLKNTQIRFRKILRFSE TLNSRFENASDFVI.....	666				
SpWin1	LITSF	YIKVLD CVRIRFRKLMSFTRILKAHLENSCEYVI.....	749				
Um01544	DRAKWI	HSVFDNVRIRSRKLLGFARDIRNRLDNAAEYDLG.....	897				
SpHdh1	HATKIL	DATQAQSEKNKFTVCRPHKKVTLKMLNS.....	516				
ScBck1	LNWNIKE	VL SHEENAPKMFKTSPKLELNLPDKGSKLN.....	762				
Um01662	TTRYFP	PASSRQVSEFQMQAGHLEPGMTVQQTTLRTQEAIWG.HTSAGSPGQAYQSAHAHP:	1049				
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	
SpByr2	.....	LGNFG.....	QEILPRS...SRRARPSE:	271			
UmKpp4	.....	VADPDAPLP	NKGSMDGHP TPLERSSISIRERGTT:	763			
ScSte11	.....	LSAESNNIG.....	DILLKHS...NAVDMA:	343			
ScSsk22	.....	MHN...AQLVKKLKD...AHYFLVYSGNTFESSGVY:	614				
ScSsk2	.....	EDH...NYLLKQLKE...TGHLFIYTGGLYEQNGTY:	852				
SpWis4	.....	SEGHLPDLVNRLST...TGHLFAYTAN.LERDGVF:	697				
SpWin1	.....	KENSLLLIQRLEE...SMHVLTYTAS.IEHGAY:	780				
Um01544	..MLRP	SSDYLDADDRVAEYSDVANNGHMSLSSFMQTLIDHDYFLVYT.EALEENGTY:	953				
SpHdh1	.....	GSSAPQSPSSNTSASVLTRNFVAHRDPPPPPTETS:	551				
ScBck1	.....	IP TPITENE SKSSFQVLKDEGTEIDFNHRRESFYTKPEL:	802				
Um01662	PGPSYGP	RDPRQPGQSNQYTGMOAYPNASAAPQMQRPSYQGSAMPNLHHVPPPRPQSY:	1109				

	. . .1270 . . .1280 . . .1290 . . .1300 . . .1310 . . .1320	
SpByr2	LVCPLSSL.....	279
UmKpp4	PVIQIGYD.....	771
ScSte11	LLQGLDQT.....	351
ScSsk22	MFAPPELLGCDNDTILRLRNKSIGCDLVPKLDIGNN.....	662
ScSsk2	LIGSPELLGCKDDDLRIIKNSDIGCDLVPKLEINNS.....	900
SpWis4	VIADHTLS.....	705
SpWin1	VIVPGHLV.....	788
Um01544	LVAEP SLQDKPDL IQELVCKCLHRVRPGEESAMAAE.....	1001
SpHdh1	SLRRKNTLT.....	560
ScBck1	APKREAPKPPAN.....	814
Um01662	SAQPPQPPRNADHRHAPFAGHSGPQMMPQSSGSSAGRAPHQPPQONQQLSQPSQPSQRE	1169
	. . .1330 . . .1340 . . .1350 . . .1360 . . .1370 . . .1380	
SpByr2	.....RISVAEDVNRLPRIDRGFD:	298
UmKpp4	.....SRSEDDHQSNARRTSSGTH:	790
ScSte11	.....RLSSKLDTTKIPKLAHKRP:	370
ScSsk22	DLNILVSKGEDSKGIPYYRVVANSSSDLDRHAHQSKKKNFSTDPFDQHLDEKNNEVFEELE:	722
ScSsk2	NSNSSLSGSDISNDGTFYYIKN...DLTTQPRSYNGNRVNRPEDFENSRSSTEEFEELE:	956
SpWis4	.....ENPEALKALLFSKDISMLE:	724
SpWin1	.....DSPNILREVL SMTFMKGDN:	807
Um01544	DGDDATGAGVG.....NANTLREQIEKQPGANASTVGANAPGTGDD:	1043
SpHdh1	.....RRPSIRHARSSPYDTGHN:	579
ScBck1	.....TSPQRTLSTSKQNKPIRLV:	833
Um01662	QPGHAQAMP GSESHRRDPPVR TMA SERSSGSSFSSQGSFQHGRPHWDDCNSRNSIEESFS:	1229
	. . .1390 . . .1400 . . .1410 . . .1420 . . .1430 . . .1440	
SpByr2	PPLTVSSTQRISSP SLQKS.....IT.....	323
UmKpp4	SHLHP SLTGPP TLPPVVSRLSLDEWSRDLK.....	825
ScSte11	EDNDAISNQLLELLSVEGEE.....	390
ScSsk22	VALSSLGALVVLYPGEPVVWDGPVYKLPGN.....	765
ScSsk2	TRLNSLGYVLVLTQEP LLWEGEHYMLSDNK.....	999
SpWis4	TIQQNC SYVL ILCPVHP IVWKGRIEKVDVP.....	760
SpWin1	NFESVPP YAVVLAPDSSICWNGHVTDLDIP.....	843
Um01544	ADDDRPRIYILLSPRDPFMWTKVMHHIMP.....	1080
SpHdh1	EASKFSHTSFDPKASSKSSNSLKE SVEALS.....	612
ScBck1	RASTKISRKRSKPLPPQLLSSPIEASSSSP.....	870
Um01662	APT SARSSQSEASAKPVNVEHRSSYADQERD.....	1279
	. . .1450 . . .1460 . . .1470 . . .1480 . . .1490 . . .1500	
SpByr2	.....VEPLYQSN.....	331
UmKpp4	.....VTEENAMFQSSRHGASGS.....	857
ScSte11	.....EDHDFFGED.....	399
ScSsk22	G..NPNTL ILLNQGSNYALTYQI.....	799
ScSsk2	...PNSIDL MCQGS SYALEYQC.....	1031
SpWis4	...KTMVRVRIIASNKREHLQAAK.....	793
SpWin1	...APNCVRLVTLATANQLSVIE.....	876
Um01544	...DRRVRLIADGAKGRLELAK.....	1130
SpHdh1	...FEDAPALDES DLG.....	636
ScBck1	YTPASTHVLIPQPYKGAN.....	898
Um01662	SATTRTDAFKSSSCDASGATVGG.SVRRSEDEDTLRAGEWAQLWRALDPKSDGTVSGTAI:	1338
	. . .1510 . . .1520 . . .1530 . . .1540 . . .1550 . . .1560	
SpByr2	.....GNEKSSKYNVSESAHGN.....	349
UmKpp4	ASGYADRP SISRRASGESARSRRSLASQVRHGLSAARERNADT.....	900
ScSte11	.....SDIVSLPTKIATPKN.....	414
ScSsk22	IEK.RC SLNSIESSLQKINKAYYKLYTIVLNNYKGLGSFMKQ.....	841
ScSsk2	LEK.KSSSE TVKNMLQRINKAYFRCTYSVLKNYTKIVTTFKKV.....	1073
SpWis4	AVECRSSITRVYKEF IRLSKLCMRISSTVVDVCVSAVREACSGV.....	836
SpWin1	VDSAKANSSKINKQMTKIKRNSLKLALSLLDVIQTIRTRYHGH.....	919
Um01544	LNDQMAHHSRVQSGLEE INKGVMYMLSDTIIRKVPEIRRLRLGLGVRARGQSGTTPRSTTTD:	1190
SpHdh1	..SS.....SQVPKENHHNIQSKLSINTEAATDLKAN.....	666
ScBck1	..DSTSTPSLKHKQKVNRSNSTVSTNSIF YSPPLLKRGNSK.....	940
Um01662	SGSSGGDGD TVRAEPSTPGASRPQTKDGATLPISLEPPRIIPSPSLAPEENGTVSSFGTFD:	1398
	. . .1570 . . .1580 . . .1590 . . .1600 . . .1610 . . .1620	
SpByr2	.....HQVLSF:	355
UmKpp4	.....A..SLLTVDE.....	922
ScSte11	.....WLKGACI:	421
ScSsk22	.....CPGNELLNSI.....	865
ScSsk2	.....SPVNDLLNNI.....	1097
SpWis4	.....N..CHDLIYHV.....	859
SpWin1	.....N..CQNLHYHS.....	942
Um01544	TAAGAGFVSCDEL IQNC.....	1221
SpHdh1	.....ELSSPK.....	686
ScBck1	.....RVVSST.....	959
Um01662	DDETESGTWAQPLDSDVNAPRLPLRLDADSEALSDDHATLLPGQDTLLQASTRGTRGFS:	1458



```

. . .1630 . . .1640 . . .1650 . . .1660 . . .1670 . . .1680
SpByr2 S.....PGSSPSFIE.....QPSP.ISP.: 372
UmKpp4 AGAGGGWVV.....DEDGVP IP IPGSSSPSSSAAAST....RPSGSSSS: 964
ScSte11 G.....SGSFGSVLG.....: 432
ScSsk22 NAFSSKRKY.....VIIFLMVKLGHNWLKFLVEECDPT...DQRTFRWCVL: 908
ScSsk2 NVANNEKRS.....IILLMLRLSIGWLKFLAEDCDPT...DQRTFRWCVT:1140
SpWis4 LSFDSYWQT.....KLKRKITS LAVEWISFICDECDLM...DRKTFRWGVG: 902
SpWin1 SILDASSIG.....LIRRKMIQLAISWVGFIYEDCSPT...DRNTFRWTVT: 985
Um01544 IES.ARLRD.....QMTLALGR LAIDWIAFICDDCVPS...ERKTFKWAVT:1263
SpHdh1 SPLSYRLR.....KSKHIRESPSSKV INSGNWEV...RPSADDLYE: 725
ScBck1 ADAPPMFDSDDSDSSSSDDIIWSKKKTAPETNNENKKDEKSDNSST.HSDEIF YDSQT:1018
Um01662 ASNSPKRPE.....LRLTIDPAAGPTVMTWTASQASTN...SPRASTSHLSS:1502

```

```

. . .1690 . . .1700 . . .1710 . . .1720 . . .1730 . . .1740
SpByr2 .....: 372
UmKpp4 YVHNGHLE.HDDSEGHSDEEA.NQSSDLEEATRTRKARGVPSKAASIRTVASKRASSVLQ:1022
ScSte11 .....: 432
ScSsk22 AMDFAMQH.TSGYNILALNV..KQFOELKERSV...VCMSELLISHFDVMGARATEAENG: 961
ScSsk2 SNEFAMHH.VSGWNILALDE..CQFSSLKQKIS...ECHSELLISHFDIIGARSIEVEKI:1193
SpWis4 ALEFLMLM.IRGNNILLIDD..AMFLKIREKVG...KSHAFLLTHFDVLGAKSKVAACL: 955
SpWin1 ALEFAMIM.TYGSNIMIDK..KSFEELKEKVG...KCVALLLLHFDVMGTHAGRSMD:1038
Um01544 ALGNAMHI.TSNENIFRLNE..QDFALLRAKVAS...CMALLISHFDILGARSSVAKAQ:1316
SpHdh1 DVDRFFPR.YDLKVLVDQ..SRMVSSPSKVS...IRPKHKSVRLLAREASEARKE: 776
ScBck1 QDKMERKHTFRPSPEVVYQNLKFFPRANLDPKITEG IASPTSPKSLDSLSPKNVASSR:1078
Um01662 ALNSGG...ITRSNSFARRDDDWAFRPPPEQLYENLDFFPKHDLDPKPLDTTAGPESGL:1559

```

```

. . .1750 . . .1760 . . .1770 . . .1780 . . .1790 . . .1800
SpByr2 .....TSTTS.....: 377
UmKpp4 APGDESDRHLGDPH.....AVARSTTSRASSVSELRRS.....:1055
ScSte11 .....: 432
ScSsk22 HQQARLN.....IDTEENIDEEATLEINS.....: 985
ScSsk2 HQQARSN.....LDLEDVFDHMLQVNS.....:1217
SpWis4 QRETEVSSSPRLT.....SFGDVEEEALSIQLLQKET.....: 988
SpWin1 QQAGDIPARLVRRN.....SDRSRLSDMELASFVKEEV.....:1071
Um01544 EEQERLEREKAERNRITIGGTDAVQNVSEDFQHLRVQSNGDSASLLERTKPALVGP GIG.:1375
SpHdh1 IR.....HMARRNKSGMLLRSS.....: 794
ScBck1 TEPSTPSRPVPPDSS.....YEFIQDGLNGKMKPLNQAKTP.....:1114
Um01662 VSSPRAEASVPSVASVG.....AQQGLSQRSRHKKSIRLVAEDR.....:1598

```

```

. . .1810 . . .1820 . . .1830 . . .1840 . . .1850 . . .1860
SpByr2 .....EDTNTLEEDTDDQS....: 391
UmKpp4 .....VHDHGDPSDGE SGSDFTDSDLSDSGSETDEDEQANDV.:1092
ScSte11 .....MNAHTGELMAVKQV....: 446
ScSsk22 RLRLEAIKTLEKTHKRNPRQHGKVL DATDQGNKYL...:1021
ScSsk2 EFRVQSIMELEERIKRNPHQTGKV IDSDKGKYL...:1253
SpWis4 MLRIDELEIERNNTLERLAIGHVLDDSVFRNRDFI.:1024
SpWin1 MHRIELESNRRDRLYKSQ LIGRVLDDTTKENRLK...:1107
Um01544 AQNLFNKLD TAMQSTEERWISKEWDAARHELDLEQRLIGRVLDDTRLEDRLQ...:1430
SpHdh1 .....TKLWGSRIVELKPDTTITSG.: 814
ScBck1 .....KRTKTIRTIAHEASLARKNSVKLKRQNTKMWGTRHVEVTENHNVSINK:1162
Um01662 .....KRILERADTRRAAQGAELSSGLVRRRSTKLWGTKVVEMTPGQELATPA:1646

```

```

. . .1870 . . .1880 . . .1890 . . .1900 . . .1910 . . .1920
SpByr2 .....IKWIRGALIGSGSFGQVYLGHNASSGELMAVKQVILDS: 429
UmKpp4 YLP.SAKPA.....PIKWHK GALIGAGSFGNVFLGHNAAKTGLLMAVKQVELPS:1139
ScSte11 .....EIKNNHIGVPTDNNKQANSDENNEQEEQOEKIEDVGAVS: 485
ScSsk22 SLASSLSNV.....SHRWQKR SFIGGGTFGQVYSAINLENGE ILAVKEIKIHD:1069
ScSsk2 SLASSISNV.....SHRWQKRNF IGGGTFGRVYSAVDLDNGE ILAVKEINIQD:1301
SpWis4 KLASFSNI.....TIRWQOGHFVRSGMFGDVYTGVMNME TGDLLAVKEIKLQD:1072
SpWin1 ELASSKSNL.....TIRWQOGGLIGSGSFGTVYRAVNLD TGDLMAVKEI VALHK:1155
Um01544 FLAQSASKI.....TIRWQOGQF IGGGTFGTVYLAVNLD SGGLMAVKEIRFQD:1478
SpHdh1 SVV.SQNA.....TFKWHK GELIGNGTYGKVFLAMNINTGEL IAVKQVEIPQ: 860
ScBck1 AKNSKGE.....YKEFAWHK GEMIGKGSFGAVYLC LNVTTGEMMAVKQVEVPPK:1210
Um01662 SATSAESPWSDTASTTG..QPVFKNVKGDLIGKGTYGRVYLALNATTGEMI AVKQVELPR:1704

```

```

. . .1930 . . .1940 . . .1950 . . .1960 . . .1970 . . .1980
SpByr2 VSE.SKDRHAK.LLDALAGETIALLQEL SHEHIVQLGSMNLSHDHLNIFLEYVPGGSVAGL: 487
UmKpp4 GDS.HLDQRKKGMLEALEREIKLLKSLEHENIVQLDSFADDSHLNIFLEYVPGGSIVAL:1198
ScSte11 HPK.TMNIHRKMVDALQHEHMLKLELHHEENIVTYGASQEGGMNLNIFLEYVPGGSVSSH: 544
ScSsk22 .....TTTHKKIFPLIKEEMTVLEMLMHPNIVQTYGVEVHRDKVNIFMEYCEGGSLSL:1123
ScSsk2 .....SKSMQKIFPLIKEEMSVLEILMHPNIVSYGVEVHRDKVNIFMEYCEGGSLSL:1355
SpWis4 .....SRTFRSTVDQIHQEMTVLERLMHPNIVTYGVEVHREKVIIFMEFCQGSLSLADL:1126
SpWin1 .....PRISRPHIKRIKGMVLVLELFDHPNIVSYGIEVHREKVNIFMELCQGSLSLFEF:1209
Um01544 .....ISSTPSLYQQIKDMEVMSMLSHPNIVEYGIEVHRDRVYIFEEYCGGSLSLAL:1532
SpHdh1 TINGRHDQLRKDIVDSINAEISMIADLDHLNIVQLGF EKTETDISIFLEYVSGSGIGRC: 920
ScBck1 YSS..QNEAILSTVEALRSVSTLKDLDHLNIVQLGFEMKNNIYSLFLEYVAGGSVSG:1268
Um01662 TASDREDSRQKGVVAALKSEIETLKDLDHPHIVSLGFEEETROFLSIFLEYVPGGSVSGSC:1764

```

	. . .1990 . . .2000 . . .2010 . . .2020 . . .2030 . . .2040	
SpByr2	LTHYGSFEE TLVKNF IKOTLKGL EYLHSGIVHHRDIKGANILVDNKGKIKISDFGISKKL: 547	
UmKpp4	LRNYGAFEEPLVRNFVROILNGLSFLHNRGIDHHRDIKGANILVDNKGKIKISDFGISKKV:1258	
ScSte11	LNNYGPFEESLITNF TROILIGVAYLHKKNIHHRDIKGANILIDIKGCVKITDFGISKKL: 604	
ScSsk22	LDHGRIEDEMVTQVYTFELLEGLAYLHQSGLVHHRDIKPENILDFNGIHKYVDFGTARTV:1183	
ScSsk2	LEHGRIEDEMVTQVYTLQLEGLAYLHSGIVHHRDVKPENILDFNGVIHKYVDFGAANKI:1415	
SpWis4	LAHGRIEDEMVLKVYVVLQLEGLAYLHSHILHHRDIKPANILDHRGMHKYSDFGSALYV:1186	
SpWin1	LRYGRIEDELVIQVYVLQLEGLAYLHSCGVSHQDVKPENILFDHNGIHKYTFDFGSANKS:1269	
Um01544	LEHGRIEDETIVIQVYTLQMLEGLIYLHSGIHRDIKPDNILLDHNGVLKHYVDFGAANKI:1592	
SpMkh1	LRNYGPFEELVRNFVSRQVLYGLSYLHSGIHRDLKADNLLIDFDGVCKISDFGISKHS: 980	
ScBck1	IRMYGRFDEPLIKHLTTOVLKGLAYLHSGILHHRDLKADNLLIDQDGICKISDFGISRKS:1328	
Um01662	LRKHGKFEESTIKSFLHQILEGLAYLHSGILHHRDLKADNLLIDFEGTCKISDFGTVRRS:1824	
	. . .2050 . . .2060 . . .2070 . . .2080 . . .2090 . . .2100	
SpByr2	E.....LNSTSTKTGG.....ARP SFOGSS: 567	
UmKpp4	ESDL.....VLATNKSAGGGG.....AGGAA.....HRP SLOGSV:1289	
ScSte11	S.....PLNKKQN.....KRASLOGSV: 621	
ScSsk22	VGSRTRTV.....RNAAVQDFG.....VETKSLN.....EMOGTP:1213	
ScSsk2	ANNGTRLA..SHNKIENADGEHEDVT.....HVSDSKAVKN..NENALLDHOGTP:1461	
SpWis4	SPTDPEVR.....YEDIQPELQ.....HLAGTP:1209	
SpWin1	GSASTKIF.....EQLTQEEEE.....FEKDSEFLQHLQNRGYSLTGTP:1310	
Um01544	AKMSRTIQ.....RSRKTGGGLGNIGMVAQGMGGKQGGPAG.....AMASLOGTP:1637	
SpMkh1	DN.....VIDNDAN.....LSMOGSI: 996	
ScBck1	KD.....IYSNSD.....MTHRGTV:1343	
Um01662	DD.....IYGNVEN.....MSLOGSI:1840	
	. . .2110 . . .2120 . . .2130 . . .2140 . . .2150 . . .2160	
SpByr2	FWDAPPEVVKQ..T.MHTEKTDIWSLGCVLIEMLTSKHPYPNCD.QMQAIFRIGENIL.PE: 622	
UmKpp4	FWDAPPEVVKQ..T.SYTIKADIWLSLGCVLVEMISGTHPWAELN.QMQALFOIGHGRK.PS:1344	
ScSte11	FWDAPPEVVKQ..T.ATTAKADIWSTGCVVIEMLTGKHPFPDFS.QMQAIFKIGTNTT.PE: 676	
ScSsk22	HYDAPETISGSASVKGKLGADDVWALGCVVLEMATGRRPWSNLDNEWAIMYHVAAGRI.PQ:1272	
ScSsk2	HYDAPESITGSTITKGKLGADDVWLSLGCVVLEMITGRRPWANLDNEWAIMYHVAAGHT.PQ:1520	
SpWis4	HYDAPPEIILG.TKKGDFGANDIWSLGCVLIEMLTGSTPWSEMDNEWAIMYHVAAGHT.PS:1267	
SpWin1	TYDAPPELILG.NP.SERVGANDIWSLGCVIVEMATGSPPWPRLDNHFLMYHVAAGHT.PI:1368	
Um01544	HYDAPPEVIKQ.TPDVPHAAADIWSLGCVVLEFATGKRPPWSNLDNEWAIMYHVAAGHT.PA:1696	
SpMkh1	FWDAPPEVIHN.DHQGYSAKVDIWSLGCVVLEMLAGRRPWS.TDEAIQAMFKLGTCKKAPP:1054	
ScBck1	FWDAPPEMVDI..KQGYSAKVDIWSLGCIVLEMLAGKRPPWSNLE.VVAAMFKIGKSKSAPP:1400	
Um01662	FWDAPPEVVSL.S.KQGYSAKIDIWSLGCVVLEMLAGRRPWSDEDE.AVQAMFKIGAQRKAPP:1898	
	. . .2170 . . .2180 . . .2190 . . .2200 . . .2210 . . .2220	
SpByr2	FP....SNISSAIDFLEKTF AIDCNLRPTASELLSHPFVS.....: 659	
UmKpp4	LP....DEISNECRDFLEKTFELDYNMRPSADELLNHAFMGTEMTFPPSSGADGSGGGDD:1400	
ScSte11	IP....SWATSEGNELRKAFELDYQYRPSALELLQHPWLDAHII.....: 717	
ScSsk22	LPNR..DEMTAAGRAFLEKCLVQDP TMRATAVELLIDPWHIQIREIAFGNSEKDQVPILS:1330	
ScSsk2	FPTK..DEVSSAGHFLERCLIQNP SKRASAVELLMDPPWIVQIREIAFGDDSSSTDTEER:1578	
SpWis4	IPQN..EKISSLARDFIEQCFERDPEQRPRAVDLLTHPWITDFRKKTIITMPPATITKKT:1325	
SpWin1	IPAD..DQLSPLGQNELKRCFVSDPNQRATAAELLMDPPWVYPLRAGTEFDLMNSSVVEA:1426	
Um01544	LPDA..NQLSPMGIEFTROCLTINARQRP TAAQLKEDPWHRSLEELDAANEAEAAAELA:1754	
SpMkh1	IPSELVSQVSPEAIQFLNACFTVMADVRPTAEELLNHPFMKCDDEEFNFKDTMLYDMLCKR:1114	
ScBck1	IPEDTLPLISQIGRNEFDACFEINPEKRP TANELL SHPFSEVNETFNFKSTRLAKFIKSN:1460	
Um01662	IPAD..VKLTQQAHEFLKNCFEIDPAKRP TAORLLDHVFTVPVPGWQF SHSALCRSLHR.:1955	
	. . .2230 . . .2240 . . .2250 . . .2260 . . .2270 . . .2280	
SpByr2	.....: 1460	
UmKpp4	DAGGSGDAGDGDASTMGHTND AETGTTRE TRETKDGKRP TRSKSTRRLEREKRHK EAAAAA:1460	
ScSte11	.....: 1331	
ScSsk22	S.....:1331	
ScSsk2	E.....:1579	
SpWis4	SLSHITITEEKTAQLLAGRHDDSKAETDSLAAASYKEE S ALPVASNVGLRQPNELRIDSINL:1385	
SpWin1	PSTNGAPLEL.....:1436	
Um01544	GVSPAGDVYDGLDSSSSGSSVTNSLDGVHGVAGGDQALFKSLDRNVSSLNSARSRWSSEA:1814	
SpMkh1	KS.....:1116	
ScBck1	DKLNSSKLRI TSQENKTE.....:1478	
Um01662	.....: 1478	
	. . .2290 . . .2300 . . .2310 . . .2320 . . .2330 . . .2340	
SpByr2	.....: 1520	
UmKpp4	AAAAATALDTGTPNTP TSH TAAAAAASASASASASAPAVASTSPAPGDAETGSP TN:1520	
ScSte11	.....: 1400	
ScSsk22	.....: 1400	
ScSsk2	.....: 1400	
SpWis4	PPAIVTPDTINYSVD.....:1400	
SpWin1	.....: 1874	
Um01544	GARTSSSGTSMITTL YNP SHSLKASLGFRQOQOQHQREQQLQOPP KSHQELGERDECETRPEQ:1874	
SpMkh1	.....: 1874	
ScBck1	.....: 1874	
Um01662	.....: 1874	

```

      . . .2350 . . .2360 . . .2370 . . .2380 . . .2390 . . .2400
SpByr2 .....:
UmKpp4 G KSAVPPAGSTGGTPESILTVSIATARGNSTSTALSAADA AF SEEADS.....:1568
ScSte11 .....:
ScSsk22 .....:
ScSsk2 .....:
SpWis4 .....:
SpWin1 .....:
Um01544 P M H V D Q N S D A D H R P L H V P G H P N H S H P G S S A I V A D L Q Y H K E N V Q R Q A M L R H D S S L S T L P D E :1934
SpHch1 .....:
ScBck1 .....:
Um01662 .....:

SpByr2 .:
UmKpp4 .:
ScSte11 .:
ScSsk22 .:
ScSsk2 .:
SpWis4 .:
SpWin1 .:
Um01544 S:1935
SpHch1 .:
ScBck1 .:
Um01662 .:

```

**Figura 63. Alineamiento de las proteínas MAPKKK** de *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*. En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.



```

      . . . . .10 . . . . .20 . . . . .30 . . . . .40 . . . . .50 . . . . .60
Mig1  HGRRKIEIKAIKDDRNRSVTFLKRKGLFKKAKHEL SVLCSDVAVIFGTHKKLYEYSSG: 60
RlmA  HGRRKIEIKAIKDDRNRSVTFLKRKGLFKKAKHELAVLCSVDVAVIFGTHKKLYEYSSC: 60
UmR lm1 HGRKKIKIKIPIKEDRNRSVTYLKRKGLFKKAKHELAVLTDSDVAVIVFGTHKKLAIEFCST: 60
HsMef2A HGRKKIKIITIRINDERNRQVTFKRRKGLFKKAKHEL SVLCDCETAL IIFNSSNKLFOYAST: 60
ScR lm1 HGRRKIEIKAIKDDRNRAVTFIKRKA GLFKKAKHEL SVLCQVDIAVILGSDMTF YEFSSV: 60

      . . . . .70 . . . . .80 . . . . .90 . . . . .100 . . . . .110 . . . . .120
Mig1  DPRELITRYT. YHGGATEHKGPSDFNG. GDDDEEEEGDGTPLDQPMDAHQDP PHFQGO.:117
RlmA  DMQDALYRHK. FLCPPHEHKGPEDFNGKRDDDDDEEEATPAPDEFHAP SQMPPQMIAV.:118
UmR lm1 DIDLLLLRYT. EYDGIARERKGRNYLHLDKSDSDNDNDDNDNDNDNDNDNSADGPMEHFAD.:118
HsMef2A DMQDKVLLKYT. EYNEPHESTRNSDIVEALNKKELHRGCDSPDPDTSYVLTPHTEEEKYKKIN:119
ScR lm1 DTNDLIYHYQNDKNLLHEVKDP SDYGDHKSASVNIHQDLRSSHNSNKP SKSNVKGHMQS:120

      . . . . .130 . . . . .140 . . . . .150 . . . . .160 . . . . .170 . . . . .180
Mig1  .GPFPPHVMRHYTP SASPP IPNGVPFPFHGHGVPRGHTPQPQMLSRPFSRMDARRMGQPM:176
RlmA  . .PHPGFQHVNHAP SASPP IHNGMPFDPR. HG. . . . .TPQPGASRPSRRMHLRRVSSML:170
UmR lm1 . . . . .PNRANGRETAGGSGRNAKGLSGTKRKSE. . . . .HRSPSGRSNGFNPSSVAAAAASSSL:171
HsMef2A .EEFDNHHNRNHKIAAPGLPPQNF SHSVTVPVTS. . . . .RNALSYTNFPGSSSLVSPSLAASS:172
ScR lm1 ENDDDENNDDEDDDHGNGFERNSSNHSNKKASD. . . . .KNITSAHQKLLSP TALISKMDGSEQ:177

      . . . . .190 . . . . .200 . . . . .210 . . . . .220 . . . . .230 . . . . .240
Mig1  GPQGSQVNGFGFGQQQSMYGPNTTHMPPHMPQMAPGPPFPYPQHPPHPPHPPHPP:236
RlmA  G. . . . .GPPHMGTPPPPPSNM. . . . .FSYMPNPS. . . . .VYMPNAP:202
UmR lm1 G. . . . .AGFDIATGPPSAKQTLN. . . . .AAIRQKSQ. . . . .MHSST:201
HsMef2A T. . . . .LTDSSMLS.PPQ. . . . .TT. . . . .:186
ScR lm1 N. . . . .K. . . . .RHPENALPFLQHLKRLKPDPLQISRTFQ. . . . .QQQQQN:213

      . . . . .250 . . . . .260 . . . . .270 . . . . .280 . . . . .290 . . . . .300
Mig1  HPQOPHQPQHQOQF IEDGRRATMPANFAPHPPPHGPMG. . . . .MQRHSVSPPQQHPHVPQL:294
RlmA  HN. MSQQPPRPFPQFAHYGHHPQGPQHQPFP. . . . .QHMQ. . . . .MPHPSVPPQSHTPQPMPLH:255
UmR lm1 HS. . . . .TSVAADFVP TOGVYHSVPFGHATMDPGMQ. . . . .HEHSVMGASMTSMAPKMS:251
HsMef2A . . . . .LHRNVSPGAPQRP. PSTG. . . . .NAGGMLSTDLTVPNG:219
ScR lm1 ISRPYHSSHYNLNQPSSSSSSPSTHDFPKLP SFQNSSFNGRPPPISISPMKFSKPF TMAS:273

      . . . . .310 . . . . .320 . . . . .330 . . . . .340 . . . . .350 . . . . .360
Mig1  PPQOPQOHPHSSPPQPOQHMQSPFPQHVKEFSPOQIEPQOQHQQOPEQEPREPEQQOQ:354
RlmA  PHAHPQQH. . . . .HPQHHPQHHPQHPPHALAQP. . . . .PTTHMSQPPHPSIP. . . . .HVAQ:302
UmR lm1 SPAMPEANNRVTGQATSSSSASANPTRAQAIAHMSICMP TDDRIPSFISPTIPGFGGLTPG:311
HsMef2A AGSSPVGN. . . . .GFVNSRASPMIGATGAN. . . . .SLGKVMPTKSPPPP. . . . .GG:261
ScR lm1 SRTPKQEHKINNSGNNNDNSNITQSPSNSLEDS. . . . .IQQTVKARRKL SARPVLRVRIPN:330

      . . . . .370 . . . . .380 . . . . .390 . . . . .400 . . . . .410 . . . . .420
Mig1  QQQSQSQSQPQEPQSEPARSLPPPPPLEVKTELAPPAQPGRIPOPSLLDTAVKKLPQK:414
RlmA  PYMADQHPHPORTASLPEAQSDQ. . . . .LQANLKTERAQSP. . . . .LIKPLSNK:348
UmR lm1 GTVVTPGGRRFSFSDVLSRCTN. . . . .MTVQRVPVASS. . . . .LVPHLFHTD:355
HsMef2A GNLGHNSRKP. . . . .DLRVVIPPSSK. . . . .:282
ScR lm1 NNFSSNSAIPSEPSSASSTANG. . . . .NSMGSSQIMKEN. . . . .KTSRSSKIS:374

      . . . . .430 . . . . .440 . . . . .450 . . . . .460 . . . . .470 . . . . .480
Mig1  QHSIFT. . . . .PIDENRSILSQHLAAFHAEP SKNKSSPPAHRSSSVDE STSNASEASRGKDK:472
RlmA  SRSIFT. . . . .PIDDHGSVLARNFIVGFGDNASVKT. . . . .ESVQNEADEKKPLKK:394
UmR lm1 TL SLTATPQDASL SAVLRSSSPLIARPAATTAHR. . . . .SMTPTYSQATYAPTS:405
HsMef2A . . . . .GMDP. . . . .PLNTQRISSSQATQPLATPVVSTT. . . . .PSLPPQGLVYSAMP:326
ScR lm1 PL SASASGRLTLQKGNNGRMVIKLPMANAPNGSNN. . . . .GNGSDNNNHPPYFPGS:424

      . . . . .490 . . . . .500 . . . . .510 . . . . .520 . . . . .530 . . . . .540
Mig1  DIASSPPLLKRADPRASISSVSSAFESAPAPP SRSNSLRAGPPRPRLKVQIPDEQSEDGS:532
RlmA  . . . . .PSP. . . . .VRAKTEAPP SNPPSEIKPPVRTNSGTLGSKRPQLKVQIPSENSD. . . . .R:443
UmR lm1 . . . . .EASLVHDMASSTGADIIRPFTAAANLELASSNHLALPVADFAQSAHA:453
HsMef2A . . . . .AYNTDYSLTADLSALQGFNSPGHLSLQGVSAWQHHLGQAALS. . . . .:370
ScR lm1 GSSPLFS. . . . .ATQPYIATPLQPSNIPGGFPQONTSLAQRQTQQYQMSFKKQSQTIV:478

      . . . . .550 . . . . .560 . . . . .570 . . . . .580 . . . . .590 . . . . .600
Mig1  . . . . .GSATAESASSAQGGASTDATSQSTRQMDSHSSSTMHVLPFPSPSASALLSAGATGFPN:589
RlmA  . . . . .GSATAESSSSAGNKAVTSAKLDASHPG. . . . .VVLPPSPSAGAIHSAQAQGFPN:493
UmR lm1 . . . . .SSASPVVHSSSVGVSTTGGSTSAIASP. . . . .FVGSSSLKASATPELVSHSTHPLA:504
HsMef2A . . . . .SLVAGGQLSQGSNLSINTNQNISIKS. . . . .EPISPPRDRMTPSGFQQQQQ:416
ScR lm1 PLTTTLTGRPPSTSGPETSNGPPPTGSLPS. . . . .KFVHDLMSNSPNVSSISHPDWSMGPNS:536

```

```

      . . . . 610 . . . . 620 . . . . 630 . . . . 640 . . . . 650 . . . . 660
Mig1  PFAPKRPPQHPAPGLN.....IDTPVSALPSRFLNNEFLPSPSSFYIP.DWNFR...:636
RlmA  PFARPPPSTTAAAAQNTTAYNNNNNIE TPISALPSRFVSDALLPSPSSFFPAEWGFGRS:553
UmRlm1 RDSLAAVSRRSSMSTD.....KETPPTHGDSAGANDARLDSSAIWFN..LGQSTD:552
HsMef2A QQQQQQPPPPPQPPQ.....PPQPQPRQEMGRSPVDSLSSSSSSSYD.....:458
ScRlm1 AKPGNTNMPGTTFPVQTAVNMGNSSNISSTNNTNNNNNNNNNNSSNNNSNNGNDNNSNNS:596

      . . . . 670 . . . . 680 . . . . 690 . . . . 700 . . . . 710 . . . . 720
Mig1  G....GDMNTLPSPLNFATPVVGTGPFSLRDENPGASLKRKSPDNL.....IHGFI:684
RlmA  G....PDSNILPSPLVFP TPQVQNGPGFGREEEQDK..KRKSPD.....GGPT:595
UmRlm1 A....KSDKTHPEQGS LVQFAPINASQTLASIPFDLKFPAQPMQ.....:592
HsMef2A .....GSDREDPRGDFHSPIVLGRPPNTEDRESPS.VKRHRMDAWV.....T.....:499
ScRlm1 NNSIYSNNEDAPVNGAAISEHTIDGDSNNQSNSSSYDAAATA YNGNTGLTPYINTAQTP:656

      . . . . 730 . . . . 740
Mig1  SDMPLEAGMEPKRVKVDS...:702
RlmA  GEG.....AAKKAKT.....:605
UmRlm1 .....:
HsMef2A .....:
ScRlm1 GTKFFNFSTDISGKNSSKI:676

```

**Figura 64. Alineamiento de las proteínas relacionadas con Rlm1 (MAD-MEF2 box).** En *U maydis* (UmRlm1), *S. cerevisiae* (ScRlm1), *M. grisea* (Mig1) *A. nidulans* (RlmA) y *H. sapiens* (HsMef2A). En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.

	. . . . 10 . . . . 20 . . . . 30 . . . . 40 . . . . 50 . . . . 60	
SpRES1	.....	
SpRES2	.....	
Um11222	.....	
NcRes2	.....	
ScMBP1	.....	
Um05338	HPLNYFANQDQTASDTYAHEASSFPAPSSILDTTSKPLQPVQEVAAASSLVDGVSTSPHA:	60
NcCdc10	.....	
SpCdc10	.....	
ScSWI4	.....	
ScSWI6	.....	
	. . . . 70 . . . . 80 . . . . 90 . . . . 100 . . . . 110 . . . . 120	
SpRES1	.....	
SpRES2	.....	
Um11222	.....	
NcRes2	.....	
ScMBP1	.....	
Um05338	SIIHASKQSPRAASSLSFTTSALQRAGLLPANPNMSTTATSGTSAASESLQRVITQGTAS:	120
NcCdc10	.....MQPPQLGGA:	9
SpCdc10	.....HASANFIRQFELGNDSTSYQKRPE:	24
ScSWI4	.....	
ScSWI6	.....	
	. . . . 130 . . . . 140 . . . . 150 . . . . 160 . . . . 170 . . . . 180	
SpRES1	.....MYNDQIHKITYSGVEVFETTING:	23
SpRES2	.....MAPRSSAVHVAVISGVEVVECFIKG:	25
Um11222	.....MSGDKTIFKATYSGVPVYECIINN:	24
NcRes2	.....MVKENVGGNPEPGIYSATYSGIPVWEYQFGV:	31
ScMBP1	.....MSNQIYSARYSGVDVYEFIHST:	22
Um05338	AAAIINGASTPAHSGPLTPAHLKMLTPAQANAALQMPVGNIPTVYLATYSNVPVYEITVRG:	180
NcCdc10	SQQSQPSSQQSF SMSQSSQSVYRQYTDPPNRLHNDHAVPTIYSLQATYSGVGVEYMEVNN:	69
SpCdc10	DEPSQPLSNRNINKLNDSSSLKDSRRIFINSQVLRDGRPVELYAVECSGMYKYMELSCGD:	84
ScSWI4	.....MPFDVLISNQKDNTHQNTTIPISKSVLLAPHSNHPVIEIATYSETDVYECYIRG:	54
ScSWI6	.....MALEEVRVYLGPHNEIPLTLTRDSE:	25
	. . . . 190 . . . . 200 . . . . 210 . . . . 220 . . . . 230 . . . . 240	
SpRES1	...FPLMKRCHDNWLNATQILKIAELDKPRTRILEKFAQKGLHEKIQGGCGKYQGTWVP:	80
SpRES2	...VSVHRRRRD SWLNATQILKVADFDPKQRTVRLERQVQIGAHEKVQGGYGKYQGTWVP:	82
Um11222	...VAVHRRRSDDWLNATQILKVVGLDKQRTVRLEREIQKGIHEKVQGGYGKYQGTWIP:	81
NcRes2	DLKEHVHRRRHDDWVNATHILKAAGFDKPARTRILEREVOKDTHEKIQGGYGKYQGTWIP:	91
ScMBP1	G...SINKRKKDDWVNATHILKAANFAKAKRTRILEKEVLKETHEKVQGGYGKYQGTWVP:	79
Um05338	...IAVHRRRGDGLWLNATQILKIAEIKTRRTKILEKSILTGEHEKIQGGYGKFGGTWIP:	237
NcCdc10	...VAVHRRQKDGWVNATQILKVANIDKGRRTKILEKEIQIGHEKVQGGYGKYQGTWIP:	126
SpCdc10	N...VALRRCPDSYFNISQILRLAGTSSSENAKELDDIIESGDYENVDSKHPQIDGVWVP:	141
ScSWI4	FETKIVHRRTKDDWINITQVFKIAQFSKTKRTKILEKESNDMHEKVQGGYGRFGGTWIP:	114
ScSWI6	TG...HFLKHLFLPILQQYHDTGYNINE TNPDSFPTDEERNKLLAHYGIANTDDRGELWIE:	83
	. . . . 250 . . . . 260 . . . . 270 . . . . 280 . . . . 290 . . . . 300	
SpRES1	SERAVELAEHYNVFD.LIQPLIEYSGSA.....	107
SpRES2	FQGVLDLATKYKVDG.IMSPILSLDIDE.....	109
Um11222	LDVAIELAERYNIQG.LLQPIITSYVPSA.....	108
NcRes2	LEQAEALARRNNIYE.RLKPIFEFOPGN.....	118
ScMBP1	LNIKQLAEKFSYD.QLKPLFDFTQTDG.....	107
Um05338	LQRAQQVAEYNVSH.LLQPILEFPATADQIPKLY.....	272
NcCdc10	FERGLEVCROYGVEE.LLSKLLTHNRGQEG.....	155
SpCdc10	YDRAISIAKRYGYE.LLQPLISFNLDLFPKFSKQ.....	175
ScSWI4	LDSAKFLVNKYEIIDPVVNSILTFQFDPNMPPPKRSKNSILRKTSPTGKITSPSSYNKTP:	174
ScSWI6	LEKCLQLLNHLNLFGLFQDAFEFEETPDQ.....	113
	. . . . 310 . . . . 320 . . . . 330 . . . . 340 . . . . 350 . . . . 360	
SpRES1	...FMHNSFTFQSNRKPTEAY.....	126
SpRES2	...GKAIAPKKKQTKQKPSVR.....	128
Um11222	...ADSPPPAPKHTISTSNRSK.....	127
NcRes2	...ESPPAPRHASKPKAPKVKPA.....	139
ScMBP1	...SASPPAPKHHASKVDRKKAIRSASTSAIME TKRNKKAEENQFQSSKILGNPTAA:	164
Um05338	...QRKKPAASARNSSASAINDARGSTPSKIYSPAPASLGGP SQQPRFLSLRPPKETHEQE:	330
NcCdc10	...ETGNVDTPTKEQAMAAQRKRMYNASSQENRGIGSTG.....	191
SpCdc10	...QQIESSSISKNLNTSSFNTRSPLRMH.....	202
ScSWI4	TKKNSSSSSTSATTTAANKGKKNASINQPMPSPLQNLVFTPTQQFQVNSSMNIHNNNDNH:	234
ScSWI6	...DEEDPSHKLPEKTKSENSKDNISKRIN.....	143

. . . 370 . . . 380 . . . 390 . . . 400 . . . 410 . . . 420  
 SpRES1 . . . . . RRNSPVKKSF SRP SHSLLYPTSS: 150  
 SpRES2 . . . . . GRRGRKPSLSSSTLHVSMEKQPN: 152  
 Um11222 . . . . . KIIPADPGALGRSRRATSIESE: 151  
 McRes2 . . . . . VPTWGSK. SAKNANPPQPGTFLPPGRKGLPAQAPD: 173  
 ScMBP1 . . . . . PRKGRPVGSTRGSRRLGLVNLQRSQSDMGFP. RPAIPNSSISTTQLPSIRSTMGPQSPT: 223  
 Um05338 . . . . . ISSAIFMPPGTAGLLSNGTFVDDRAASALAYPGPPAIPPGSTPAEQAAALRSYNVYGYPQ: 390  
 McCdc10 . . . . . TFFKNISSTASTAVAAISKARFDSAPRMRSGP SRAP SFMRQSS: 235  
 SpCdc10 . . . . . FSNP SKSSKNGVHTINNMQSSPSPSSSFLPLTQIDSNVSKRS: 245  
 ScSWI4 . . . . . TTHNFNDTRHNLINNISHNSNQSTIIQQQKSIEHNSFNNHYSATQKPLQFFPIP TNLQN: 294  
 ScSWI6 . . . . . N. . . . . LQDMSLSDAHRELGSPLKKLKIDTSVIDAESDSTPNTARGKPM: 189  
  
 . . . 430 . . . 440 . . . 450 . . . 460 . . . 470 . . . 480  
 SpRES1 . . . . . NNMTSTRMSGIH. . . . . : 163  
 SpRES2 . . . . . SSISPTIESSHNK. . . . . : 165  
 Um11222 . . . . . VIGAAPNNVSEGS. . . . . : 164  
 McRes2 . . . . . YNDADTHQDDDDTP. . . . . : 187  
 ScMBP1 . . . . . LGILEEERHDSRQQQPQQNNS. . . . . : 244  
 Um05338 . . . . . GVPLPSSAAADGNGTEAAATA. . . . . : 411  
 McCdc10 . . . . . HQDVADFPNSQQSLVSTEYAT. . . . . : 256  
 SpCdc10 . . . . . NNYLSTSPPILEQRLKRHRID. . . . . : 266  
 ScSWI4 . . . . . KNVALNMPNNMDSNSYSHNIDNVINSSNNNNNGNNNNLIIVPDGPMQSQQQQHHHEYL TN: 354  
 ScSWI6 . . . . . DINKGPGSDNENNGTDDNDRTAG. . . . . : 212  
  
 . . . 490 . . . 500 . . . 510 . . . 520 . . . 530 . . . 540  
 SpRES1 . . . . . : 163  
 SpRES2 . . . . . : 165  
 Um11222 . . . . . : 164  
 McRes2 . . . . . : 187  
 ScMBP1 . . . . . AQF. . . . . KEIDLEDGLSSDVEPQQQLQVFMQNTGFVPPQQQSSLIQTQ: 288  
 Um05338 . . . . . ASTGAGK. . . . . REASETDQDGASAAKRSRLTSPQQQRRDDGLLLGPSPVKDL: 459  
 McCdc10 . . . . . QTQNASSGFGSQTTQPLAGDGLQPPRKRQRVLTPARSFGGQTPGHQPLDPF: 308  
 SpCdc10 . . . . . VS. . . . . D. . . . . EDL: 272  
 ScSWI4 . . . . . NFNHSHMDSITNGNSKKRRKKLNQSNQQFYNQQEKIQRHFKLHKQPLLWQSFQMPNDHH: 414  
 ScSWI6 . . . . . . . . . . PIITFTHDLTSD: 225  
  
 . . . 550 . . . 560 . . . 570 . . . 580 . . . 590 . . . 600  
 SpRES1 . . . . . DALSLQSDFTSRPDHPS. . . . . DSFTGSLHDIKASPF: 195  
 SpRES2 . . . . . VNLPGAEQVSATPLPASPALLSPN. . . . . DMTIKPVEELGLMLEA: 206  
 Um11222 . . . . . MSPSPSDISSSRTPSPLPADRAHPL. . . . . HANHALAGYNGRDAN: 205  
 McRes2 . . . . . DNLTVASASYMAEDDRYDHSHTG. . . . . RKRKRDELIEDHTEQ: 228  
 ScMBP1 . . . . . QTESHATSVSSSPSLPTSPGDFADSNPFEEFPGGGTSPILSHIPRYPVTSRPQTSIND: 348  
 Um05338 . . . . . NALGPAGGSLRAASAPRGHRTVGPDDAAGR. . . . . DG. . . . . AVPRYADRALPPKYDE: 509  
 McCdc10 . . . . . NAGNIANGDSGSPTEPSNFSNYDQVTDMDG. . . . . ASYALGLRPLPYENNA: 356  
 SpCdc10 . . . . . HPSSQLNDNEASSLPDTPRLNHSLS. . . . . FVSLVSSLPLDQNIHQ: 315  
 ScSWI4 . . . . . NEYCDNSGSHNNNNHTIASNGSSIEVFSSNENDNSHNNSSRSHTPF SAGNTSSQMKLENKH: 474  
 ScSWI6 . . . . . LSSPLKINKALPSPVVNDNEQKMKLEAFLQR. . . . . LLFPEIQEMPTSLNN: 271  
  
 . . . 610 . . . 620 . . . 630 . . . 640 . . . 650 . . . 660  
 SpRES1 . . . . . SSNNYAQSLLDYELLPMNT. . . . . TQPPDFVYDRPSDWD. . . . . : 228  
 SpRES2 . . . . . PLDKYEESSLDFFLHPPE. . . . . GRIPSFLYSPPPDFQ. . . . . : 239  
 Um11222 . . . . . NHARYADIILDYFVTEN. . . . . TTVP SLLIMPPDFN. . . . . : 237  
 McRes2 . . . . . QHAVYGDLELDYFLLSR. . . . . NEQPAVRPDPFPNFK. . . . . : 260  
 ScMBP1 . . . . . KVNKL SKLVDFYISMEKKS. . . . . NKSLQVLLHPPHSAP. . . . . : 385  
 Um05338 . . . . . GEKMRDRRLVSLFSDDGVLPGVSEATGAGASQSAADEDDDAYVAKLDSLADLREKASLG: 569  
 McCdc10 . . . . . DAEAKRGHNLGLFDANGPE. . . . . EAIQAALCNVSPQE. . . . . : 390  
 SpCdc10 . . . . . DYHTSKDILTSLFDVN. . . . . FADSSALEAKLSDSLD. . . . . : 348  
 ScSWI4 . . . . . TDQEQKQTLTILSSERSSD. . . . . VDQALLATLYPPAPKNFN. . . . . : 512  
 ScSWI6 . . . . . DSSNRNSEGGSSNQQQQ. . . . . HVSFDSLLOQEVNDAFPN. . . . . : 305  
  
 . . . 670 . . . 680 . . . 690 . . . 700 . . . 710 . . . 720  
 SpRES1 . . . . . VMAGIDEDGHTALHWAANGNLEMOHAQLQ. . . . . AGANVVAVNYLQ: 270  
 SpRES2 . . . . . VNSIDDDGHTLSLHWACSHGHIEHKLILR. . . . . ANADIGVCNRLS: 281  
 Um11222 . . . . . PDHSDDDGHTALHWAACNHRIRVVKLLLS. . . . . AGADIRVNSNQ: 279  
 McRes2 . . . . . PDWFDIMERHTCLHWAASAGDQVDMRQKK. . . . . FGASLDAQNVRG: 302  
 ScMBP1 . . . . . YIDAPIDPELHTAFHWACSHGNLPIAEALYE. . . . . AGTSIRSTNSQG: 428  
 Um05338 . . . . . GLGASGTDGPKATVDLITDDHGHTALHWAASALCRVKLVRTVARPPWQGGGANIHAGNHAG: 629  
 McCdc10 . . . . . LDSPIDTQSHALHWAATLSRMPLLRALIH. . . . . AGANPWRVNACG: 432  
 SpCdc10 . . . . . LDVPIDELGHAALHWAASAVAKPPLLQALIH. . . . . KGANPLRGNLTG: 390  
 ScSWI4 . . . . . IMFEDDQGHPLHWAATAMANIPLIKMLIT. . . . . LNALALQCNMKG: 554  
 ScSWI6 . . . . . TOLMLNIPVDEHGNTPLHWTLSIANLELVKHVVK. . . . . HGSNRLYGDMMG: 351



. . . 730 . . . 740 . . . 750 . . . 760 . . . 770 . . . 780  
 SpRES1 Q T S L M R C V M F T H N Y D L Q T F E V V S E L L Q S A I C H M D S F G Q T V F H I A L L A S S K S K M . E A A R Y : 329  
 SpRES2 Q T P L M R S V I F T H N Y D C Q T F G Q V L E L L Q S T I Y A V D T N G S I P F H I V Q S T S T P S K V . A A A K Y : 340  
 Um11222 Q T A L M R A T M F S N N Y D L R K P E L F E L L H R S I L N I D R N D R T V F H I V V D L A L S R G K P . H A A R Y : 338  
 NcRes2 E T P F M R A V N F T N C F E K Q T F P Q V M K E L F S T I D C R D L S G C T V I H A A V M K I G R V N S Q S C S R Y : 362  
 ScMBP1 Q T P L M R S S L F H N S I T R R T F P R I F Q L H E T V F D I D S Q S Q T V F H I V K R K S T P . . . S A V Y : 484  
 Um05338 E T A L H R S S L V T N S Y D A S S P T L L N L L S S L N I D F K K R T V L H I S L V A A L K G R . A A S A R Y : 688  
 NcCdc10 E T A L M R A C T V T N S H E N N T F P E L L D L L G C T L D V T D D K G R T V L H I A V T S A V K G R . H Y A S R Y : 491  
 SpCdc10 E T A L H R S V L V T N H L N Q N S F G D L L D L Y A S L C P T D R A G R T V F H I C L T A G I K G R . S A S R Y : 449  
 ScSWI4 F N C I T K S I F Y N N C Y K E N A F D E I I S I L K I C T I P D V N G R L P F H I L I E L S V M K S K N P H I I K S : 614  
 ScSWI6 E S C L V K A V K S V N N Y D S G T F E A L L D Y L Y P C L I L E D S M N R T I L L H I I T S G M T G C S . A A A K Y : 410

. . . 790 . . . 800 . . . 810 . . . 820 . . . 830 . . . 840  
 SpRES1 Y H D I L L Q M L T A T Q S V . . . . . D . . . . . V A A Q I I N L O D D H G : 358  
 SpRES2 Y L D C I L E K L I S I Q P F . . . . . E . . . . . N V V R L V N L O D S N G : 369  
 Um11222 Y H E T H I N R L A D Y G . . . . . D . . . . . Q L A D I L N F O D D E G : 365  
 NcRes2 Y L E I I L N R L Q E T H H P . . . . . E . . . . . F V Q L L D A O D N D G : 391  
 ScMBP1 Y L D V V L S K I K D F S P Q . . . . . Y . . . . . R I E L L N T O D K N G : 513  
 Um05338 Y L A C V L E H I S A E K N . . . . . S . . . . . K Y K G L I D A O D E D G : 716  
 NcCdc10 Y L E S L L E W V V R Q G S A P S S Q E N G I G D R K G R R M G I A R . . . . . F H S E I V N A O D M S G : 539  
 SpCdc10 Y L E T L L N W A K K H A S G N N G . . . . . Y M L K . . . . . D F I N Y L N H O D K N G : 484  
 ScSWI4 Y H D S I I L S L G Q O O D Y N . . . . . . . . . . L L K I C L N Y O D N I G : 642  
 ScSWI6 Y L D I L M G W I V K K Q N R P I Q S G T N E K E S K P N D K N G E R K D S I L E N L D L K W I I A M L N A O D S N G : 470

. . . 850 . . . 860 . . . 870 . . . 880 . . . 890 . . . 900  
 SpRES1 D T A L L I C A R N G A K K C A R L L L S F Y A S S S I P H N Q G Q Y P T D F L S S K D M S F E M D D S . . . . . 411  
 SpRES2 D T S L L I A A R N G A M C V N S L L S Y N A N P S I P N R Q R R T A S Y L L E A D K K P H S L L Q S . . . . . 422  
 Um11222 E T P L T H A A R A R S K R L V R L L L E H G A D P K I R N K E G K N A E D Y I I E D E R F R S S P S R T G . . . . . 419  
 NcRes2 N T A V H L A A M R D A R K C I R A L L G R G A S T D I P N K Q G I R A E E L I K E L N A S I S K S R S N L P O R S S S : 451  
 ScMBP1 D T A L H I A S K N G D V V F F N T L V K M G A L T T I S N K E G L T A N E I H N Q Q Y E Q H I Q N G T N Q H V N S S : 573  
 Um05338 E T A L G I V A R L G N A S H V R M L D V G A R K D L A N A L G I R P S D W G I E S S A D G A S L T P S . . . . . 769  
 NcCdc10 D T A L N V A A R V G N R S I I S Q L L E V G A D P T I P N R A N L K P L D F G I G I A D A E T M D D P A Q E K T G . A : 598  
 SpCdc10 D T A L N I A A R I G N K N I V E L H Q A G A S A Y I P N R A G L S V A N F G I F V E N A L K Q P E D S . . . . . 537  
 ScSWI4 N T P L H L S A L N L N F E V Y N R L V L G A S T D I L N D N E S P A S I O K F N T P A G G S N S R N N O N T K A D : 702  
 ScSWI6 D T C L N I A A R L G N I S I V D A L L D Y G A D P F I A N K S G L R P V D F G A G T S K L O N T N G G D . . . . . 523

. . . 910 . . . 920 . . . 930 . . . 940 . . . 950 . . . 960  
 SpRES1 . . P L N S K I E D N L I D N L K Y P . . . . . Q S L D D H L S S K K P I S Y F S N K L T H Q T L P N V F T Q L S E L S K : 465  
 SpRES2 . . N S N A S H S A F S F S . . . . . G I S P A I I S P S C S S H A F V K A I P S I S S K F S Q L A E : 466  
 Um11222 . . P A G I E L G A D G L P . . . . . V L P T S S L H T S E A G O R T A G R A V T L M S N L L H S L A D : 464  
 NcRes2 P F A P D T Q R H D A F H E A I S E S . . . . . M V T S R K N S Q P N Y S S D A A N T V Q N R I T P L V L Q K L K D L T A : 507  
 ScMBP1 N T D L N I H V N T N N I E T K N D V N S H V I H S P V S P S D Y I T Y P S Q I A T N I S R N I P N V N S M K Q M A S : 633  
 Um05338 . . Q N D G T N T V A S L P L T A A D L A S Q N P S D I I S A L T R P A Q V P V M K S S D V R D Q L S S T L D D L Q S : 827  
 NcCdc10 T T G S G H K S R E T S D E V V R S I T H L I G E S A S I F O M E L K K K Q E S I D T L H S Q L R V T S S Q V G D A R R : 658  
 SpCdc10 . . . K Q T K V S L M S E N . . . . . L S S K E K T A V P P R Q K S R D I I A S V T D V I S S L D K : 579  
 ScSWI4 R K L A R N L P Q K N Y Y Q Q Q Q Q Q Q Q P Q N N V K I P K I I K T O H P D K E D S T A D V N I A K T D S E V N E S Q Y : 762  
 ScSWI6 . . E N S K M V S K G D Y D G Q K . . . . . N G K A K K I R S Q L L K N P P E T T S L I N D V Q N L L N S I S K : 572

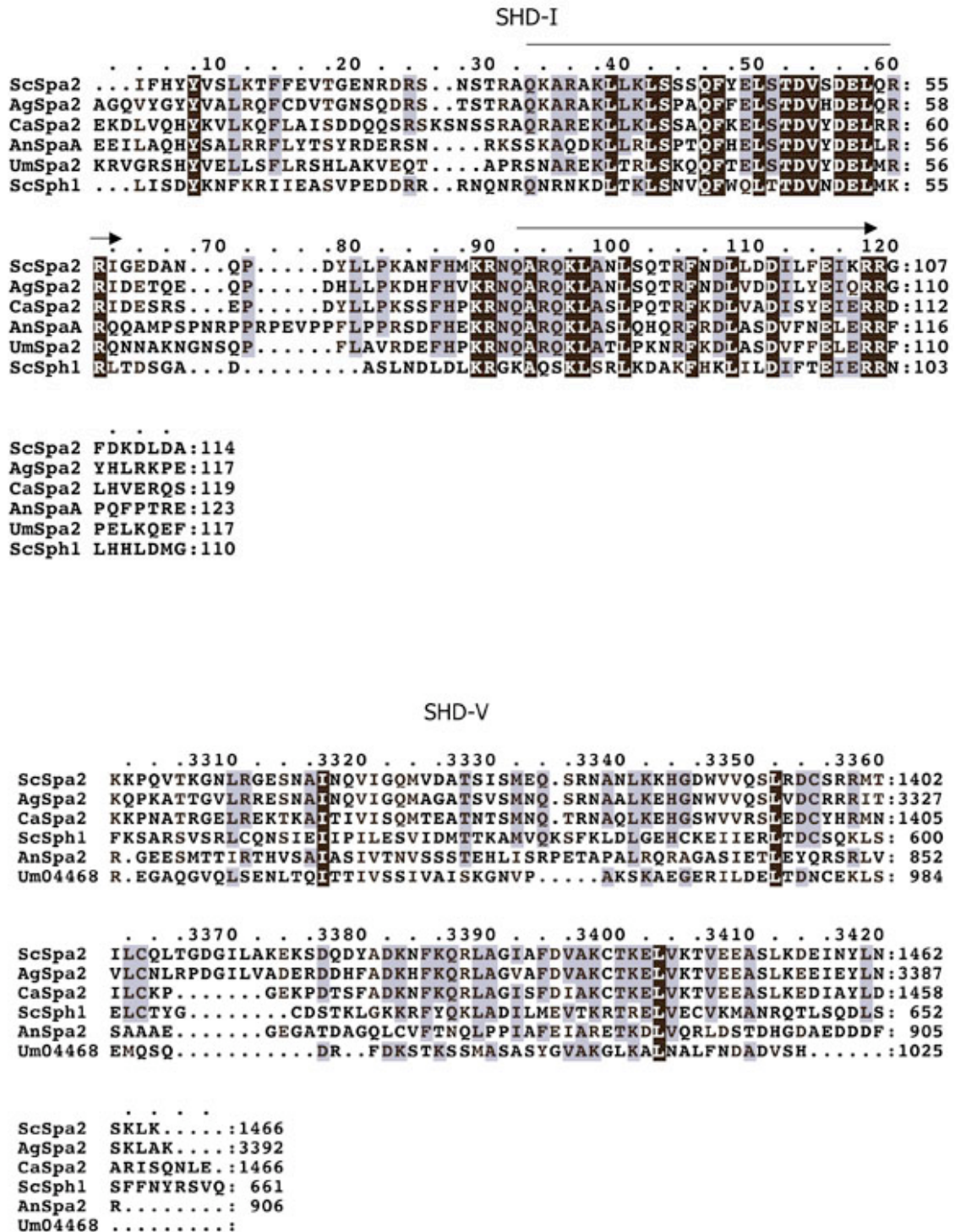
. . . 970 . . . 980 . . . 990 . . . 1000 . . . 1010 . . . 1020  
 SpRES1 C H E A S L A E K Q . . . . . L T Y N L A H E A L E Q T V R E T E T C Q R L W N E R T N N D E N Y L V N : 512  
 SpRES2 E Y E S Q L R E K E . . . . . E D L I R A N R L K Q D T L M E I S R T Y Q E L T F L Q K N N P T Y S Q S : 513  
 Um11222 S Y D S E I N T A E . . . . . K K L T Q A H G L L K Q I Q T E I E D S A K V A E A L H H E A Q G V D E E : 511  
 NcRes2 T Y D S E F K E D . . . . . D A E K E A R R I L N K T Q S E L K A L T A S I D D Y N S R L T D D V A : 554  
 ScMBP1 I Y N D L H E Q H D N . . . . . E I K S L Q K L T S I S K T K I Q V S L K T L E V L K E S S K D E N G E A Q : 683  
 Um05338 S F E R E L K E K Q . . . . . D A V S T V Q S H L Q A A T R D L A A R R K T V S A A Q A K L A E K D E A : 874  
 NcCdc10 T L E S L Q E K L K . . . . . A Q Q L A K Q I V M N R A C E E E Q I L I E L E Q R H G R L D V A : 704  
 SpCdc10 D F Q D E N A A K Q S . . . . . M I D S A Y T Q L R E S T K K L S D L R E Q L H V S E T Q R T L F L E L : 626  
 ScSWI4 L H S N Q P N S T N M T I M E D L S N I N S F V T S S V I K D I K S T P S K I L E N S P I L Y R R R S Q S I S D E K E : 822  
 ScSWI6 D Y E N E T V Q Y N . . . . . E K L E K L H K E L N E Q R E E L A N S R E Q L A N V K Q L K D E Y S L M : 619

. . . 1030 . . . 1040 . . . 1050 . . . 1060 . . . 1070 . . . 1080  
 SpRES1 Q R E D L I H Q C K K F L H T . . . . . L K T A R Y Y L E T V Q L H Q L K K . . . . . Y V T Y F : 550  
 SpRES2 H E N L I R E A Q E T Y Q L . . . . . S K R L I W L E A R Q I F D L E R S L K P H T S L . . . . . S I S F : 559  
 Um11222 R K R V D S L Q A L K H A I . . . . . N K R A R D L E R R V S E G K Q A I K R A R L Q A G L E P G A L . . . . . S T S N A : 564  
 NcRes2 A K T A A E M A T A R H K V L . . . . . A F V T H Q N R I S V Q E A V K Q E L A A L D R A N A V T N G T S . . . . . T K S K S : 607  
 ScMBP1 T N D D F E I L S R L Q E Q N . . . . . T K K L R K R L I R Y K R L I K Q K L E Y R . . . . . Q T V L L : 725  
 Um05338 R A N V Q N L R R A I V A Q L G L E E A D A L S L E Q L V E E A A N A S A A P A D K S A D K H D I . . . . . D G A E D : 930  
 NcCdc10 S A N A W E



	. . .1090 . . .1100 . . .1110 . . .1120 . . .1130 . . .1140	
SpRES1	SQIWSTDELADISETKNLVGHDTKTMR.....	577
SpRES2	SDFLKKEDGLSLNNDFKKPACNMVNTSDE..YEQ.....	591
Um11222	TNAPATGDQKSKDDAKSLIEALPAGTNVKTATIAE.....	598
NcRes2	SSP SKKPKL SP IPDQKDKPPKDENETESEAHPDPFAAQAHQQQPGPSSQDTEVEDQDRE:	667
ScMBP1	NKL IEDE TQATTNMTVEKDMNTLERLE.....	752
Um05338	VKPVASMLETLIDDLSTDTIQSDLKAVGTSVAVTQEVVEQD.....E.....	973
NcCdc10	AALQAQSKKELKYRRLVSLCTRRPEIEVEALLDTLTR.....	798
SpCdc10	PFTVNENNNKKNLSIAELKFQVAAVERN.....	693
ScSWI4	LQRIMGEEIKNLDNEVVE TESSISNNKKRLITIAHQIEDAFDSVSNKTPIN.....	933
ScSWI6	SDFLEDKLGKNYEGDISKLLAEESKEQ.....	699
	. . .1150 . . .1160 . . .1170 . . .1180 . . .1190 . . .1200	
SpRES1	.....SSLSSKHEVDLFTAENEAAREKL.....V.EQLCSLQAQRKQK:	614
SpRES2	.....LINKLTSLOASRKKDTLYIRKLYEELGI.....D.DTVNSYRRLIAMS:	633
Um11222	.....LRKQLSQVQANKTELVDKFVARAREQGT.....G.RTHAAYRRLIAG:	640
NcRes2	EEEDDYTHRLSLAAELRSILOEQRSAENDYVEARGHLGT.....G.ERIDKYKHLHMSC:	720
ScMBP1	.....LAQELTMQLQKRNKLSLVKKFEDN.....AKIHKYRRIIREG:	791
Um05338	.....LVRLRWLVSTYQSSCDELSTTISELEDSS.....A.KKESQCCQVVAIC:	1016
NcCdc10	.....AVESEKPELEIARCDKDCWSLAALRGAGVWGGGG.DDGSHVQSFDFQD:	847
SpCdc10	.....EARLMELANKLWQRNSN.....IKSKCRRVVSCLC:	722
ScSWI4	.....SISDLQSRIKE TSSKLNSEKQMF IQSLEKSQALKLATIVQDEE SKVDHMTNSS:	986
ScSWI6	.....IHEQIRNQLPAEKIQSHLPPTVLLKARIN.....AYKRNDKHLTNVLDIT:	743
	. . .1210 . . .1220 . . .1230 . . .1240 . . .1250 . . .1260	
SpRES1	IN....EILNLLSMGHYNTINTDQSGS.....	637
SpRES2	CG....INPEDLSLEILDAVEEALTREK.....	657
Um11222	CGGIAPDEVDVAVGVLCCELLQE SHTGARAGAGGERDDRDARDVAMHLKGAGAAALANAGA:	700
NcRes2	LFPDEQENLEENLEEMIKLMEQEDESVDLPAGAVGGGGGGNAADGSGGGGQPSNGRRES:	780
ScMBP1	TEMN.IEEVDSSLDVILQTLIANNNKMKGAEQIITISNANSHA.....	833
Um05338	AN.IPQDKVESHLDELLTAHESDGPDVDLARVANFMQKVKGKTRENGDQPGVGAQLSSSTS:	1075
NcCdc10	DPDSDDDPRKEDDDEQGNIDEPEKHGVHSGSAGDIVDGLLTDRDDGDHEEDSPLSSLSSS:	907
SpCdc10	TG.VDESRVDSLESLQLQAVE SDGQQQGEVDMGRVAGFLRVVKEHQA.....	767
ScSWI4	SHPEKQEDEEP IPKSTSETSSPKNTKADAKF SNTVQESYDVNETLRLATELTILQFKRRM:	1046
ScSWI6	ISTKQSELENKFRRLVLSCLKIDENKVDNHL DGLLQAISSEDPQDIDTDEMMDFLKKHAS:	803
	. . .1270 . . .1280 . . .1290 . . .1300 . . .1310 .	
SpRES1	.....	
SpRES2	.....	
Um11222	P.....	701
NcRes2	VLPALRGNGDGEHSRRGSR TAAAAAAQVDGERE INGRAGAERTERIQEIAAV:	833
ScMBP1	.....	
Um05338	LSTAVSSGGTAASSVVP AVERDGEDAKPDA.....	1105
NcCdc10	SQATTPOGRPD AEQRKPDVARGTGLKKCRVKDCSFAGSGGDFNLHKKVVHK..:	958
SpCdc10	.....	
ScSWI4	TTLKISELSKINSVSKLDKYRNLIGITITENIDSKLDDIEKDLRANA.....	1093
ScSWI6	.....	

**Figura 65. Alineamiento de los factores de transcripción de la familia Swi4, Swi6 y Mbp1.** De *U maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *N. crassa*. En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.



**Figura 66. Alineamiento de los dominios SHD-I y SDH-V de las proteínas de la familia Spa2.** De *S. cerevisiae*, *A. gossypii*, *C. albicans*, *A. nidulans* y *U. maydis*. Dentro de la región SHD-I se indican los repetidos predichos para el dominio GIT. En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.

		. . . . . 70 . . . . . 80 . . . . . 90 . . . . . 100 . . . . . 110 . . . . . 120	
SpRho2	P I R . . . . .	R K L V V V G D G A C G K T S L L S V F T L G Y F F T E Y V P T V F E N Y V S : 47	
UmRho2	A I R . . . . .	R K L V I V G D G A C G K T S L L C V F A I G E F P Q E Y E P T I F E N Y V A : 46	
ScRho2	A V R . . . . .	R K L V I I G D G A C G K T S L L I V F T L G K F F E Q Y H P T V F E N Y V T : 46	
SpRho1	E L R . . . . .	R K L V I V G D G A C G K T C L L I V F S K G T F F E V Y V P T V F E N Y V A : 45	
SpRho5	E L R . . . . .	R K L V I V G D G A C G K T C L L I V F S K G T F F E V Y V P T V F E N Y V A : 45	
UmRho1	E L R . . . . .	R K L V I V G D G A C G K T C L L I V F S K G T F F E V Y V P T V F E N Y V A : 44	
ScRho1	S I R . . . . .	R K L V I V G D G A C G K T C L L I V F S K G T F F E V Y V P T V F E N Y V A : 49	
SpRho4	E T S . . . . .	K K L V V V G D G G C G K T C L L I V F S S G T F F E R Y V P T V F E N Y I T : 53	
UmRho4	D A P P G Q G Q I Q Q L P G R P H I D L K K L V V V G D G G C G K T C L L I V Y S Q N K F P Q E Y V P T V F E N Y V P : 71		
SpCdc42	. H P . . . . .	T I K C V V V G D G A V G K T C L L I S Y T T N K F P S D Y V P T V F D N Y A V : 42	
UmCdc42	. H Q . . . . .	T I K C V V V G D G A V G K T C L L I S Y T T N K F P S E Y V P T V F D N Y A V : 42	
ScCdc42	. H Q . . . . .	T I K C V V V G D G A V G K T C L L I S Y T T N Q F P A D Y V P T V F D N Y A V : 42	
UmRac1	. H Q . . . . .	T I K C V V V G D G A V G K T C L L I S Y T T N A F P G E Y I P T V F D N Y S A : 42	
ScRho5	. H R . . . . .	S I K C V I I G D G A V G K T S L L I S Y T T N S F F T D Y V P T V F D N Y S T : 42	
ScRho4	Q H K R T N . . . . .	K L P D Y H L K I V V V G D G A V G K T C L L I S Y V Q G T F P T D Y I P T I F E N Y V T : 111	
ScRho3	N K P . . . . .	I E R K I V I L G D G A C G K T S L L N V F T R G Y F F E V Y E P T V F E N Y I H : 55	
SpRho3	K K P . . . . .	I Y R K I V I L G D G A A G K T S L L N V F T K G Y F P Q V Y E P T I F E N Y I H : 52	
UmRho3	S H R . . . . .	I A R K V L V L G D G A S G K T S L L F V L V R H E F P Q T E P T V F E N Y T H : 57	
		. . . . . 130 . . . . . 140 . . . . . 150 . . . . . 160 . . . . . 170 . . . . . 180	
SpRho2	D C R V D G . . . . .	K S V Q L A L W D T A G Q E E Y E R L R P M S Y : 77	
UmRho2	E I R L D G . . . . .	K P V Q L A L W D T A G Q E E Y E R L R P L S Y : 76	
ScRho2	D C R V D G . . . . .	I K V S L T L W D T A G Q E E Y E R L R P F S Y : 76	
SpRho1	D V E V D G . . . . .	R H V E L A L W D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 75	
SpRho5	D V E V D G . . . . .	R H I E L A L W D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 75	
UmRho1	D V E V D G . . . . .	R H V E L A L W D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 74	
ScRho1	D V E V D G . . . . .	R R V E L A L W D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 79	
SpRho4	D I T Y G P N S . . . . .	K V I E L A L W D T A G Q E E Y D R L R P L S Y : 85	
UmRho4	I I Q F E G . . . . .	K T I E L A L W D T A G Q E E Y D R L R P L S Y : 101	
SpCdc42	T V M I G D . . . . .	E P Y T L G L E D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 72	
UmCdc42	T V M I G E . . . . .	D P Y T L G L E D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 72	
ScCdc42	T V M I G D . . . . .	E P Y T L G L E D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 72	
UmRac1	N V H V D G . . . . .	K P V S L G L W D T A G Q E D Y D R L R P L S Y : 72	
ScRho5	T I A I P N G T A S S P L E D N G N D K R G S L S S A S S P S T D R K L Y K I N L W D T A G Q E D Y D R L R P L C Y : 102		
ScRho4	N I E G P N G . . . . .	Q I I E L A L W D T A G Q E E Y S R L R P L S Y : 142	
ScRho3	D I F V D . . . . .	S K H I T L S L W D T A G Q E E F D R L R S L S Y : 85	
SpRho3	D I F V D . . . . .	G N S I E L S L W D T A G Q E E Y D Q L R S L S Y : 82	
UmRho3	I Q H T H T . . . . .	G L A V E L T L W D T A G Q E E F D K L R S L S Y : 88	
		. . . . . 190 . . . . . 200 . . . . . 210 . . . . . 220 . . . . . 230 . . . . . 240	
SpRho2	A K A H I I L V G F A I D S P D S L E N V S T K W I E E I N T L C . . . . .	P N V P F I L V G H K A D L R S : 126	
UmRho2	S Q A H V I L I A F A I D T P D S L E N V Q V K W H E E V R Q I C G . . . . .	P S V P V L L V G C K K D L R E : 126	
ScRho2	S K A D I I L I G F A V D N F E S L I N A R T K W A D E A L R Y C . . . . .	P D A P I V L V G L K K D L R Q : 125	
SpRho1	P D S H V I L I C F A V D S P D S L D N V Q E K W I S E V L H F C . . . . .	S S L P I L L V A C K A D L R N : 124	
SpRho5	P D S H V V L I C F S V D A P E S L D N V Q E K W I S E V L H F C . . . . .	S N L P I L L V G C K V D L R N : 124	
UmRho1	P D S H V I L I C F A V D S P D S L D N V Q E K W I S E V L H F C . . . . .	H S L P I I L V G C K K D L R H : 123	
ScRho1	P D S N V V L I C F S I D L P D S L E N V Q E K W I A E V L H F C . . . . .	Q G V P I I L V G C K V D L R N : 128	
SpRho4	P M S N V I L L C F S I D C P A S L N V T E K W P E V Q H F C . . . . .	P R T P I V L V G L K A D L R K : 134	
UmRho4	P E S D V I L I C F A V D F P T S L A N V Q D K W F P E I N H F C . . . . .	E G V P I L L V G L K T D L R K : 150	
SpCdc42	P Q T D V F L V C F S V T S P A S F E N V K E K W F P E V H H H C . . . . .	P G V P C L I V G T Q I D L R D : 121	
UmCdc42	P Q T D V F L V C F S V T S P A S F E N V K E K W F P E V H H H C . . . . .	P G V P C L I V G T Q V D L R D : 121	
ScCdc42	P S T D V F L V C F S V I S P P S F E N V K E K W F P E V H H H C . . . . .	P G V P C L V V G T Q I D L R D : 121	
UmRac1	P Q T D V F L V C F S L V S P P S F E N V R T K W P E V S H H A . . . . .	P N I P T I L V G T K D L R E : 121	
ScRho5	P Q T D I F L I C F S V S E H A S F A N V T E K W L P E L K O T S N I E G T S L Y T K L G K Y P I L L V G T K S D L R D : 162		
ScRho4	T M A D V L H V C Y S V G S K T S L K N V E D L W F P E V K H F C . . . . .	P S T P I H L V G L K S D L Y E : 191	
ScRho3	S D T Q C I H L C F S I D S R D S L E N V Q N K W G E I T D H C . . . . .	E G V K L V L V A L K C D L R N : 134	
SpRho3	S D T H V I H I C F A V D S R D S L E N V I T K W L P E V S S N C . . . . .	P G V K L V L V A L K C D L R G : 131	
UmRho3	A D T D V V L L C F S V D N P V S L Q N V E S R M I A E I R H H C . . . . .	P A V K I H L V A L K C D L R E : 137	
		. . . . . 250 . . . . . 260 . . . . . 270 . . . . . 280 . . . . . 290 . . . . . 300	
SpRho2	D P V A . . . . .	I E E M R R R N . . . . . Q N F V K S Q Q A E L V A Q R I G A R K Y H E C S S L : 165	
UmRho2	D . . A . . . . .	I A K G K P V Q . . . . . G H Y V E R Q Q A K L V A A Q I G A R S Y H E C S S L : 163	
ScRho2	E . . A . . . . .	H F K E N . A T . . . . . D E H V P I E D A K Q V A R A I G A K K Y H E C S A L : 161	
SpRho1	D P K I . . . . .	I E E L S K T N . . . . . Q H P V T T E E G Q A V A Q K I G A Y K Y L E C S A K : 163	
SpRho5	D P K T . . . . .	I E E L S K T S . . . . . Q K P I T F E E G Q V V A Q K I G A Y K Y L E C S A K : 163	
UmRho1	D P K I . . . . .	V D E L R K T S . . . . . Q R P V S A E E G M A V A Q K I G A V R Y L E C S A K : 162	
ScRho1	D P Q T . . . . .	I E Q L R Q E G . . . . . Q Q P V T S Q E G Q S V A D Q I G A T G Y Y E C S A K : 167	
SpRho4	D R N A . . . . .	T E V L R T Q G . . . . . L T P V T Y Q Q A Q S V A L S H M A P . Y V E C S A K : 172	
UmRho4	D A N S . . . . .	L A M L Q A Q G . . . . . T K P V T P A Q G Q H V A D E I G A A K Y V E C S A K : 189	
SpCdc42	D P S V . . . . .	Q O K L A R Q H . . . . . Q H P L T H E Q G E R L A R E L G A V K Y V E C S A L : 160	
UmCdc42	D H A V . . . . .	I E K L A R S K . . . . . Q R P V P F E A G E R L A R E L G A V K Y V E C S A L : 160	
ScCdc42	D K V I . . . . .	I E K L Q R Q R . . . . . L R P I T S E Q G S R L A R E L K A V K Y V E C S A L : 160	
UmRac1	D P E T . . . . .	I A K L R D R R . . . . . H O P I T Y A Q G N Q M A R D I H A T K Y L E C S A L : 160	
ScRho5	D P A T . . . . .	Q K K L Q E A N . . . . . S D I V S Q E E I D E L V Q R C G F H G Y T E C S A A : 201	
ScRho4		A D N L S . . . . . D L V E P S S A E S L A K R L G A F A H I O C S A R : 222	
ScRho3	N E N E S N A I T P N N I Q Q D N S V S N D N G N N I N S T S N G K M L I S Y E E G L A M A K K I G A L R Y L E C S A K : 194		
SpRho3	A D E E . . . . .	Q V D H S . . . . . K . I I D Y E E G L A A A K K I N A V R Y L E C S A K : 166	
UmRho3	P R N P . . . . .		R . T L S Y N H G L D V A K R I N A C R Y L E C S A K : 167



		310	320	330	340	350	360	
SpRho2	TGDGVDDVFEAATR	...	AALTVRDS	...	...	...	...	:187
UmRho2	NNQGVDAVFEAATR	...	AAMLVRNSGASSGG	...	...	...	...	:191
ScRho2	TGEGVDDVFEVATR	...	TSLLMKKE	...	...	...	...	:183
SpRho1	TNEGVRVFEAATR	...	AAMLKHK	...	...	...	...	:184
SpRho5	LNQGVNEVFEAATR	...	ASHLKFK	...	...	...	...	:184
UmRho1	TGEGVRVFEHATR	...	AALVQRS	...	...	...	...	:183
ScRho1	TGYGVREVFEEATR	...	ASLMGKS	...	...	...	...	:188
SpRho4	ENTGVNEVFEAATR	...	LTIKKS	...	...	...	...	:192
UmRho4	TKDGVQNVFDTAIR	...	EACRKKG	...	...	...	...	:210
SpCdc42	TQKGLKNVFEAIV	...	AALDP	...	...	...	...	:179
UmCdc42	TQKGLKNVFEAIV	...	AALDP	...	...	...	...	:179
ScCdc42	TQKGLKNVFEAIV	...	AALDP	...	...	...	...	:179
UmRac1	TQKGLKGVFEAIR	...	SVLAPA	...	...	...	...	:180
ScRho5	TQAGVREVFQAVRY	...	AIYEPESPNQKSANHTLTDELTTATTNTNGDKNIREQKQOP	...	...	...	...	:257
ScRho4	LKENIDEVFEAIAHTLLSDSLYAPREPHTTIKN	...	...	...	...	...	...	:255
ScRho3	LNKGVNEAFTEAAR	...	VALTAGPV	...	...	...	...	:216
SpRho3	LNRGVNEAFTEAAR	...	VALAAQPR	...	...	...	...	:188
UmRho3	SNRGVTECFTELAS	...	VAANVRP	...	...	...	...	:188
		370	380	390	400	410	420	
SpRho2	...	...	...	...	...	...	...	:187
UmRho2	...	...	...	...	...	...	...	:202
ScRho2	...	...	...	...	...	...	...	:183
SpRho1	...	...	...	...	...	...	...	:192
SpRho5	...	...	...	...	...	...	...	:190
UmRho1	...	...	...	...	...	...	...	:186
ScRho1	...	...	...	...	...	...	...	:198
SpRho4	...	...	...	...	...	...	...	:192
UmRho4	...	...	...	...	...	...	...	:219
SpCdc42	...	...	...	...	...	...	...	:183
UmCdc42	...	...	...	...	...	...	...	:183
ScCdc42	...	...	...	...	...	...	...	:183
UmRac1	...	...	...	...	...	...	...	:184
ScRho5	HHNNSTDSTLPKGLQOEKEALNPKTKKGGQKDKIHEQSKSKGSKIASNNHHNKQAKPKT	...	...	...	...	...	...	:317
ScRho4	...	...	...	...	...	...	...	:279
ScRho3	...	...	...	...	...	...	...	:219
SpRho3	...	...	...	...	...	...	...	:191
UmRho3	...	...	...	...	...	...	...	:188
		430						
SpRho2	..ENDKSS...TKCCIIIS	:200						
UmRho2	..HNDAGS...CKCIVL	:214						
ScRho2	....PGA...NCIIL	:192						
SpRho1	....TKKK...KRCIIL	:202						
SpRho5	....TKKK...KHCILL	:200						
UmRho1	.....RK...KGCTVL	:194						
ScRho1	...TEKKK...KKCVLL	:209						
SpRho4	...FSFSK...KSCVIL	:203						
UmRho4	...AGGAK...KKCVLL	:230						
SpCdc42	....KKK...SKCLVL	:192						
UmCdc42	....KK...SKCAIL	:191						
ScCdc42	....KS...KKCAIL	:191						
UmRac1	....KKK...NNCHIL	:193						
ScRho5	RNDKKKKK...SKCVIL	:331						
ScRho4	..TKRLRK...NKCIIH	:291						
ScRho3	..VKSDS...GSSCTIH	:231						
SpRho3	..DGADESHGTGCIIA	:205						
UmRho3	..HPHS...RACTIA	:198						

**Figura 67. Alineamiento de las proteínas de la familia Rho de *S. pombe*, *U maydis* y *S. cerevisiae*.** En fondo negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los conservados.